



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**Evaluación de actividad quitinolítica de cepas de
Lecanicillium en medios hidrófobos utilizando compuestos
orgánicos volátiles.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

I.B.I. MARÍA DEL CARMEN MARÍN CERVANTES.

Comité tutorial:

Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto¹ (Directora de tesis)

Dr. Sergio Revah Moiseev²

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura³

¹Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa.

²Departamento de Ingeniería de Proceso e Hidráulica, UAM-Iztapalapa.

³Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa.

Agosto 2006

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O.”

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SEP-CONACyT, No. 2004-C01-46173. Asimismo agradezco a la Unión Europea el financiamiento otorgado a través del proyecto Alfa Polylife para asistir al curso de Biopolímeros en la Universidad de Concepción en Chile.

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

I.B.I. MARÍA DEL CARMEN MARÍN CERVANTES.

El día 24 de Agosto de 2006

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

H. Jurado

Presidente: Dr. Sergio Revah Moiseev.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ingeniería de Proceso e Hidráulica.

Secretario: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Sinodales: Dra. Raquel Alatorre Rosas

Colegio de Postgraduados Instituto de Fitosanidad.

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mariano Gutiérrez y Dra. Raquel Alatorre que revisaron pacientemente esta tesis.

A la Dra. Keko Shirai por el apoyo recibido en la realización de mi trabajo y los conocimientos transmitidos.

Al Dr. Damián Matsumura, Dr. Sergio Revah, Miguel y Lety por sus consejos, enseñanza, paciencia y apoyo en la realización del trabajo.

A mis compañeros de proyecto Elizabeth y Marlet por su optimismo y ánimo. Y a todos mis compañeros de laboratorio por su amistad y compañía.

Y en especial a mi familia, por todo su esfuerzo, comprensión y apoyo en todo este tiempo.

INDICE

	Contenido	Pág.
Índice		v
Lista de figuras		viii
Lista de tablas		xii
Resumen		1
Abstract		3
I. Introducción.		5
II. Antecedentes.		13
III. Justificación.		15
IV. Objetivos.		16
V. Hipótesis.		16
VI. Materiales y métodos.		17
VI.1 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos.		17
VI.1.1 Microorganismos.		17
VI.1.2 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en cultivo sumergido.		18
VI.1.2.1 Preparación de inóculo.		18
VI.1.2.2 Conteo de esporas.		18
VI.1.2.3 Medio de cultivo líquido para selección de cepas degradadoras de hidrocarburos.		18
VI.1.2.4 Cultivo de cepas degradadoras de hidrocarburos en medio sumergido.		19
VI.1.2.5 Medición de biomasa por peso seco de medio sumergido.		19
VI.1.2.6 Microscopía óptica en medio sumergido.		19

VI.1.3 Selección de cepa degradadoras de hidrocarburos en cultivo superficial.	20
VI.1.3.1 Medio de cultivo superficial para selección de cepas degradadoras de hidrocarburos y productoras de quitinasas.	20
VI.1.3.2 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en cultivo superficial.	21
VI.1.3.3 Determinación del crecimiento radial y halos de hidrólisis de quitina.	21
VI.1.3.4 Determinación de biomasa por peso seco de medio superficial.	21
VI.1.3.5 Microscopia óptica en medio superficial.	22
VI.1.3.6 Microscopia electrónica.	22
VI.2 Determinación de actividad degradadora de hidrocarburos y quitinolítica en microcosmos.	22
VI.2.1 Medio de cultivo sumergido para microcosmos.	22
VI.2.2 Fermentación de cepas de <i>Lecanicillium</i> para evaluación de actividad degradadora.	22
VI.2.3 Fermentación de cepa degradadora de hidrocarburos <i>Lecanicillium lecanii</i> 2149, para determinación de actividad quitinolítica en función del tiempo.	23
VI.2.4 Extracto enzimático.	23
VI.2.5 Determinación de n-hexano o tolueno.	24
VI.2.6 Determinación de CO ₂ y O ₂ .	24
VI.2.7 Determinación de parámetros de consumo de hidrocarburos y producción de bióxido de carbono de las cepas de <i>Lecanicillium</i> EH-460, 157 y 2149.	24
VI.2.8 Determinación de biomasa.	25
VI.2.9 Determinación de actividad de N-acetil hexosaminidasa.	27
VI.2.10 Determinación de endoquitinasas.	27
VI.2.11 Determinación de azúcares reductores (DNS).	28

VI.3 Estandarización de técnicas para determinar la expresión de hidrofobinas.	28
VI.3.1 Medios de cultivo para determinar la expresión de hidrofobinas.	28
VI.3.2 Extracción de ARN	28
VI.3.2.1 Determinación de la integridad de ARN	30
VI.3.3 Reacción de retrotranscripción (RT)	30
VI.3.3.1 Determinación de cADN	31
VI.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
VI.3.4.1 Amplificación del gen que codifica a la hidrofobina SC3 de secuencias de ADN.	31
VI.3.4.2 Análisis de los productos de PCR.	32
VII. Resultados y discusiones.	33
VII.1 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en medio sumergido.	33
VII.2 Selección de cepas en medio superficial.	39
VII.3. Determinación de actividad degradadora de hidrocarburos (hexano o tolueno) y quitinolítica en microcosmos de cepas de <i>Lecanicillium lecanii</i> .	56
VII.3.1. Evaluación de actividad degradadora y quitinolítica de <i>Lecanicillium</i> EH-460, 157 y 2149, en medio sumergido.	56
VII.3.2 Evaluación de actividad quitinolítica de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149, en presencia de n-hexano o tolueno con o sin quitina coloidal.	72
VII.4. Determinación del efecto de hidrocarburos en la actividad quitinolítica de <i>Lecanicillium lecanii</i> 2149 en microcosmos.	76
VII.5 Determinación de la expresión de hidrofobinas.	85
VII.5.1 Implementación de las técnicas para determinar la expresión de la hidrofobina SC3: Aislamiento de ARN y RT-PCR.	86
VIII. Conclusiones	90
IX. Perspectivas	92
X. Trabajos presentados y publicaciones.	93
XI. Bibliografía.	94
Anexos	102

LISTA DE FIGURAS

	Contenido	Pág.
Figura 1.	Estructura de un polímero de β -1-4-N-acetil-glucosamina.	5
Figura 2.	Rutas de oxidación de hidrocarburos alifáticos, terminal, subterminal y biterminal.	8
Figura 3.	Rutas de degradación aerobia de hidrocarburos aromáticos por hongos y bacterias.	9
Figura 4.	Estructura primaria de la hidrofobina SC3.	10
Figura 5.	Modelo de la formación de la hifa aérea de hongos filamentosos.	11
Figura 6.	Representación gráfica de mediciones de diámetros de crecimiento radial y halo de hidrólisis de quitina coloidal sobre agar en cajas Petri.	21
Figura 7.	Biomasa determinada por peso seco de cepas de <i>Lecanicillium</i> y <i>B. bassiana</i> en cultivos sumergidos con medio mineral y la mezcla de hidrocarburos (n-hexano y tolueno), con o sin la adición de extracto de levadura. (A) Matraces con baffles y tapón de algodón y (B) Matraces con tapón de rosca	34
Figura 8.	Micrografías a 40x de <i>Lecanicillium</i> 2149 en medio mineral con	35

mezcla de n-hexano y tolueno a 25°C y 180 rpm, empleando la condición: a) matraz con baffles y tapón de algodón; b) matraz con tapa de rosca.

- Figura 9. Micrografías a 100x de *L. lecanii* 2149 creciendo a 25°C y 180 rpm, en medio mineral líquido en matraces con baffles y tapones de algodón: a) glucosa y extracto de levadura (control); b) n-hexano y tolueno. 36
- Figura 10. Micrografías a 100x de *Lecanicillium* 991 a 25°C y 180 rpm en medio mineral líquido en matraces con baffles y tapones de algodón: a) glucosa y extracto de levadura (control); b) n-hexano y tolueno. 36
- Figura 11. Diámetro de las hifas de *Lecanicillium* y *B. bassiana*, en medio mineral, variando la fuente de carbono, en matraces con baffles y tapón de algodón medidas en micrográficas a 100x. 38
- Figura 12. Crecimiento radial de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en medio mineral con n-hexano y/o tolueno como fuentes de carbono, a 25°C. 40
- Figura 13. Biomasa de *Lecanicillium* y *B. bassiana* de medio mineral con n-hexano y/o tolueno como fuente de carbono, a 25°C. 41
- Figura 14. Diámetro de hifas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* crecidas en medio mineral empleando n-hexano y/o tolueno como fuente de carbono, medidas en micrográficas a 100x. 43
- Figura 15. Micrográficas a 100x de *Lecanicillium lecanii* 2149 en cultivo superficial. 44
- Figura 16. Crecimiento radial de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en medio mineral, quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno). 45
- Figura 17. Halos de hidrólisis de quitina coloidal de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana*. 46
- Figura 18. Biomasa de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en medio mineral con quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno) como fuente de carbono, a 25°C. 48
- Figura 19. Diámetro de hifas de *Lecanicillium* crecidas en medio mineral con quitina coloidal empleando n-hexano y/o tolueno como fuente de 49

	carbono, medidos en micrográficas a 100x.	
Figura 20.	Micrográficas a 100x de <i>L. lecanii</i> 2149 en cultivo superficial de medio mineral con quitina; quitina y mezcla de n-hexano/tolueno; quitina y n-hexano; d) quitina y tolueno, a 25°C.	50
Figura 21.	Crecimiento radial de cepas de <i>Lecanicillium</i> y <i>B. bassiana</i> en medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno).	51
Figura 22.	Biomasa de cepas de <i>Lecanicillium</i> y <i>B. bassiana</i> de medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno), a 25°C.	53
Figura 23.	Diámetro de hifas de <i>Lecanicillium</i> en medio mineral con glucosa y quitina coloidal con n-hexano y/o tolueno, de micrográficas a 100x.	54
Figura 24.	Crecimiento miceliar de <i>L. lecanii</i> 991 a 8,500x en medio mineral con glucosa, quitina coloidal y n-hexano o n-hexano	55
Figura 25.	Consumo de n-hexano en microcosmos con medio líquido de las cepas de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149.	58
Figura 26.	Consumo de n-hexano en microcosmos con medio líquido y quitina coloidal de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149.	59
Figura 27.	Producción de CO ₂ en medio mineral con quitina coloidal y n-hexano de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149.	60
Figura 28.	Consumo de tolueno en microcosmos con medio líquido de las cepas de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149.	64
Figura 29.	Consumo de tolueno en microcosmos con medio líquido y quitina coloidal de de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149.	65
Figura 30.	Producción de CO ₂ por las cepas de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149, en medio mineral con tolueno y quitina coloidal como fuente de carbono.	67
Figura 31.	Mediciones de pH de medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, en microcosmos a 25°C, 180 rpm, de <i>L. lecanii</i> : EH-460, 157 y 2149.	69
Figura 32.	Biomasa (proteína total) producida en microcosmos con medio	70

	mineral variando la fuentes de carbono, a 25°C y 180 rpm de <i>L. lecanii</i> a los 80 días de incubación: EH-460, 157, 2149.	
Figura 33.	Actividad volumétrica de N-acetil-hexosaminidasa de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149, en medio mineral con n-hexano o tolueno con o sin quitina coloidal.	73
Figura 34.	Actividad volumétrica de endoquitinasas de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149 en medio mineral con n-hexano o tolueno con o sin quitina coloidal.	74
Figura 35.	Concentración de azúcares reductores determinados en medio líquido con quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y tolueno) a 25°C, 180 rpm, de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149	75
Figura 36.	Curvas de biomasa (proteína total) de <i>L. lecanii</i> 2149, en medio mineral con o sin quitina coloidal, y/o tolueno como fuente de carbono a 25°C y 180 rpm.	77
Figura 37.	Concentración de proteína soluble a través del tiempo de <i>L. lecanii</i> 2149, en medio mineral con o sin quitina coloidal y/o tolueno a 25°C y 180 rpm.	79
Figura 38.	pH a través del tiempo de medio mineral con <i>L. lecanii</i> 2149 a 25°C y 180 rpm, con sin quitina coloidal, y/o tolueno.	80
Figura 39.	Actividad quitinolítica (volumetrica) de <i>L. lecanii</i> 2149 en medio mineral con quitina coloidal en microcosmos a 25°C y 180 rpm.	81
Figura 40.	Actividad específica de N-acetil hexosaminidasas (líneas continuas) y consumo de tolueno (líneas puntuadas) de <i>L. lecanii</i> 2149	82
Figura 41.	Actividad específica de endoquitinasas (líneas continuas) y consumo de tolueno (líneas puntuadas) de <i>L. lecanii</i> 2149	83
Figura 42.	Concentración de azúcares reductores liberados por <i>L. lecanii</i> 2149, en microcosmos con medio mineral con quitina coloidal a 25°C, 180 rpm.	85
Figura 43.	Desarrollo de micelio aéreo de <i>Schizophyllum commune</i> y <i>Lecanicillium lecanii</i> 2149 en medio de cultivo líquido	86
Figura 44.	Electroforesis de ARN extraído de <i>Lecanicillium lecanii</i> 2149 de	87

medio control A (CA) y control B (CB)

Figura 45. Electroforesis de los productos de PCR amplificados para el gen de 88
ciclofilina, de *Lecanicillium lecanii* 2149.

Figura 46. Electroforesis de los productos de PCR amplificados para el gen de 89
hidrofobina SC3, de *Lecanicillium lecanii* 2149.

LISTA DE TABLAS

	Contenido	Pág.
Tabla 1.	Descripción de cepas de <i>Lecanicillium</i> y <i>Beauveria bassiana</i> .	17
Tabla 2.	Tratamientos para la selección de cepas degradadoras de hidrocarburos y determinación actividad quitinolítica.	20
Tabla 3.	Parámetros cinéticos de consumo de n-hexano o tolueno por <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149 en microcosmos con medio mineral, con o sin quitina coloidal a 180 rpm y 25°C.	62
Tabla 4.	Parámetros cinéticos de producción de CO ₂ de <i>L. lecanii</i> EH-460, 157 y 2149, estimados en microcosmos con medio mineral enriquecidos con quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano o tolueno) a 180 rpm y 25°C	63
Tabla 5.	Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>L. lecanii</i> 2149, de medios con o sin quitina o tolueno.	77
Tabla 6.	Rendimientos enzima-biomasa de la cepa <i>L. lecanii</i> 2149, en microcosmos con medio mineral, con diferentes fuentes de carbono, a 25°C y 180 rpm.	84

RESUMEN

Los hongos filamentosos se caracterizan por su capacidad de colonizar sustratos hidrofílicos e hidrofóbicos, como la cutícula de insectos. Entre los procesos involucrados en el desarrollo de hongos entomopatógenos sobre la cutícula de los insectos se encuentra la formación de hifas y otras estructuras especializadas que secretan enzimas degradadoras, como quitinasas, proteasas, lipasas y moléculas surfactantes, conocidas como hidrofobinas (St. Leger *et al*, 1998). Los hongos se caracterizan por la formación de biopelículas hidrofóbicas, siendo esta una característica importante para la biodegradación de hidrocarburos (Ortiz *et al*, 2003). Crespo *et al*, 2002 reportaron que usando n-hexadecano como sustrato, la capacidad entomopatógena de *Beauveria bassiana* incremento en el gorgojo del frijol. Por otro lado *Lecanicillium* (anteriormente *Verticillium*) ha sido reportado como productor de quitinasas extracelulares (Matsumoto *et al*, 2004).

El objetivo inicial de este trabajo fue la evaluación de la capacidad degradadora y el crecimiento de hongos entomopatógenos y micoparásitos en presencia de hidrocarburos; veintidós cepas de *Lecanicillium* y una de *Beauveria bassiana* fueron cultivadas en medio sumergido y superficial. Puro tolueno o n-hexano o la mezcla (en una relación de 17:83 por ciento) fueron empleados, al mismo tiempo que extracto de levadura, glucosa o quitina coloidal. De acuerdo con los resultados, todas las cepas de *Lecanicillium* fueron capaces de crecer en medio con hidrocarburos con y sin la adición de otras fuentes de carbono (extracto de levadura, quitina coloidal o glucosa). Con la presencia de hidrocarburos se observó inhibición en el desarrollo del hongo, presentando un micelio fino, escaso, en aglomerados, con un número considerable de esporas sin germinar. El diámetro de las hifas fue significativamente menor con la presencia de n-hexano, indicando que la inhibición es mayor que con tolueno. Fue medido el consumo de n-hexano y tolueno en cultivos sumergidos con o sin quitina coloidal de las cepas EH-460, 157 y 2149 (que presentaron el crecimiento más alto), la degradación fue determinada de 41% a 57% después de las 400 h, observando mayor degradación con tolueno que con n-hexano. La cepa 157 presentó el consumo más alto (15.7 g tolueno/m³) y velocidad máxima de consumo (7.9X10⁻³ g tolueno/m³·h). Cuando se añadió

quitina al medio de cultivo con n-hexano esta fue consumida en las primeras horas, mientras que en medio con tolueno se observó un efecto diuxico. La actividad de endoquitinasas (Endo) y N-acetil-hexosaminidasa (NHasa) fue determinada de los medios con o sin quitina, por tanto estas enzimas también son producidas en presencia de hidrocarburos. El efecto del tolueno con la presencia de quitina fue medido en la cepa 2149. Estos experimentos confirman la expresión de NHasa y Endo (una actividad máxima de 0.27 mU/ml y 11 U/ml respectivamente) en medio sin quitina como inductor.

Con la finalidad de analizar la expresión de la hidrofobina SC3 se extrajo ARN de *L. lecanii* 2149, crecido en medios de cultivo con glucosa o fructuosa, se realizó la retrotranscripción hacia ADNc y se amplificó la región específica de hidrofobina SC3 por la técnica de PCR, utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia del ADN complementario de la hidrofobina SC3 de *Schizophillum commune*, reportada en el Gene Bank.

ABSTRACT

The filamentous fungi are characterized by their capacity to colonize hydrophilic and hydrophobic substrates, such as the cuticle of insects. Among the processes involved in the development of entomopathogenic fungi on the cuticle of insects it is found the hyphae formation and other specialized structures that secrete degrading enzymes degradadoras, such as chitinases, proteases, lipases and surfactants molecules, known as hydrophobins (St. Leger *et al*, 1998). The fungi are characterized by the formation of hydrophobic biofilms being this an important characteristic for the biodegradation of hydrocarbons (Ortiz *et al*, 2003). Crespo *et al*, (2002) reported that using n-hexadecane as the substrate, the entomopathogenic capacity of *Beauveria bassiana* increased to bean weevil. On the other hand *Lecanicillium* (previously named *Verticillium*) has been reported to be an extracelullar chitinases producer (Matsumoto *et al*, 2004).

The initial aim of this work was the evaluation of degrading capacities and growth of entomopathogenic and mycoparasitic fungi in presence of hydrocarbons; twenty two strains of *Lecanicillium* and one of *Beauveria bassiana* were cultivated in submerged and superficial media. Pure toluene or n-hexane or their mixtures (in a percentage ratio 17:83) were used, along with yeast extract, glucose or colloidal chitin. According to the results, all the strains of *Lecanicillium* were able to grow using hydrocarbons with or without the addition of other carbon sources. With the presence of hydrocarbons it was observed inhibition in the development of the mycelia presenting fine, scarce, in agglomerates with a considerable amount of non germinating spores. The hyphae diameter was significantly smaller with the presence of pure n-hexane, indicating that the inhibition is bigger than with pure toluene. Was measured the n-hexane and toluene consumptions in submerged cultures with or without colloidal chitin of the strains EH-460, 157 and 2149 (that presented the highest growth), degradation was determined as 41% to 57% after 400 h, and it was observed higher degradation with toluene than with the n-hexane. The strain 157 presented the highest consumption (15.4 g toluene/m³) with a maximum speed of consumption (7.9x10⁻³ g toluene/m³*h). When adding chitin to the medium culture with n-hexane it was consumed in

the first hours, while what in medium with toluene was observing a diauxic effect. The activity of endochitinases (Endo) and N-acetyl hexosaminidase (NHase) was determined from the media with or without chitin, therefore these enzymes were also induced by the presence of hydrocarbons. The effect of the toluene with presence of chitin was measured in the strain 2149. These experiments confirmed the expression of NHase and Endo (a maximum activity of 0.27 mU/ml and 11 U/ml respectively) in media without chitin as inducer.

In order to identify the SC3 hydrophobin expression RNA was extracted from *L. lecanii* 2149, previously selected and grown in submerged media with glucose or fructose, and the hydrophobin SC3 cDNA was amplified using specific primers designed from the *Schizophillum commune* sequence reported in the Gene Bank.

I. INTRODUCCIÓN.

Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos ampliamente distribuidos en la naturaleza, se caracterizan por ser saprofitos, pueden ser patógenos o simbioses de plantas o animales. En los hongos, las quitinasas son enzimas morfogénicas que forman parte integral del metabolismo de la pared celular, siendo las microfibras de quitina el componente estructural de mayor cantidad en la pared celular.

La quitina es un polímero lineal de β -1-4-N-acetil-glucosamina (NAG) [Figura 1], se encuentra como componente en las cáscaras o cutículas de artrópodos, crustáceos e insectos; en los nemátodos; en los moluscos; en gusanos y en algas; es componente estructural de las paredes celulares del hongo y algunas algas; siendo el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa.

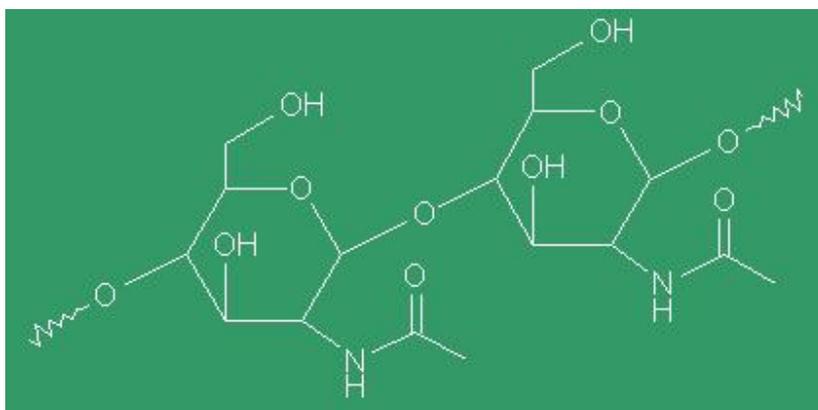


Figura 1. Estructura de un polímero de β -1-4-N-acetil-glucosamina.

La hidrólisis enzimática de la quitina es llevada a cabo por dos sistemas sinérgicos y consecutivos: endoquitinasas productoras de oligómeros solubles de N-acetilglucosamina y exoquitinasas que actúan progresivamente en los extremos no reductores de la quitina liberando N-acetilglucosamina (Tronsmo *et al*, 1996; Deshpande, 1986; Nuero, 1995; Flach *et al*, 1992). Los compuestos solubles que resultan pueden ser incorporados por las células y servir como fuentes de carbono, nitrógeno y energía.

Las enzimas quitinolíticas juegan un papel en la disolución de cutículas del insecto durante la penetración por hongos entomopatógenos, consideradas importantes por su habilidad antagónica contra parásitos vegetales que tienen paredes celulares quitinosas o exoesqueletos como los hongos e insectos, respectivamente. El conocimiento de estas enzimas ha hecho posible el mejoramiento de las cepas productoras de quitinasas aumentando de esta forma sus rendimientos (Sahai *et al*, 1993), haciendo posible mejores agentes de biocontrol.

En la biotecnología las quitinasas son de importancia por sus diversas aplicaciones, como el control de fitopatógenos (Fenice *et al*, 1997, Lorito *et al*, 1994, Gooday 1996, Yedidia *et al*, 1999, Flach *et al*, 1992), para la producción de glucosamina, quitinolímeros y N-acetilglucosamina, de uso en medicina como en tratamientos contra la artritis (Flach *et al*, 1992; Ramírez *et al*, 2006), en la bioconversión de quitina para la producción de proteína unicelular (Revah and Carroad, 1981), en la remoción de la pared celular de los hongos, con liberación de proteínas y productos intracelulares o bien para la obtención de protoplastos (Deshpande, 1986) y en el aprovechamiento de los desechos (crustáceos) que se pueden emplear para de diversos productos.

Para mejorar los rendimientos de enzimas quitinolíticas han empleado ensilados de desechos de camarón y paredes celulares de *Agaricus bisporus*, que funcionan como inductoras (Matsumoto *et al*, 2004, Shirai 2004, Quijano *et al*, 2004, Iglesias *et al*, 2002), habiendo un incremento considerablemente en presencia de quitina.

Sustratos hidrofóbicos como los hidrocarburos fueron utilizados con el fin de aumentar la capacidad entomopatógena de hongos filamentosos, *Beauveria bassiana* se creció en n-hexadecano como única fuente de carbono, presentando un incrementó notorio en su actividad en contra del gorgojo de frijol (Crespo *et al*, 2002). Existiendo pocos reportes en que se describa el efecto de los hidrocarburos sobre la actividad entomopatógena o los mecanismos relacionados (como actividad quitinolítica).

Los hidrocarburos son objeto de estudio a causa de los problemas de contaminación ambiental que ocasionan. Para su eliminación han aplicado diferentes técnicas como métodos físicos (como absorción, adsorción, incineración, etc.) o biológicos (como biofiltros) que mostraron ventajas a los anteriores, estos consisten en reactores con un lecho biológicamente activo donde se han utilizado bacterias, hongos o consorcios. Ha ganado cierto interés la utilización de hongos filamentosos en biofiltros, que a diferencia de las bacterias son más resistentes a condiciones ácidas y la desecación. Además de que la capacidad de los hongos de formar micelio aéreo les permite estar en contacto directo con los gases y tomar los compuestos hidrofóbicos gaseosos rápidamente (Ortiz *et al*, 2003). Esta característica puede ser conferida por la presencia de hidrofobinas, sin embargo, no se ha estudiado la relación existente entre esta proteína y la producción de enzimas.

Entre los sistemas o mecanismos que se reportan para la degradación de hidrocarburos por los hongos filamentosos se tiene a las oxigenasas. Las oxigenasas son hemoproteínas, que son enzimas encargadas de incorporar uno o dos átomos de oxígeno en el hidrocarburo para iniciar la oxidación de este. Posteriormente, con la ayuda de otros sistemas enzimáticos se continúa la oxidación a productos de más fácil asimilación por el microorganismo, formando ácidos carboxílicos que entren en β -oxidación o productos intermediarios de alguna ruta metabólica. Las oxigenasas se pueden dividir en dos tipos dependiendo del número de moléculas de oxígeno que pueden introducir: monooxigenasas y dioxigenasas.

Las monooxigenasas son las encargadas de introducir una molécula de oxígeno a un compuesto xenobiotico como los hidrocarburos gracias a un complejo multienzimático, formando una molécula más reactiva. La actividad de las monooxigenasas puede observarse tanto en hidrocarburos alifáticos como algunos aromáticos. En los hidrocarburos alifáticos (alcanos, alquenos y alquinos) las monooxigenasas actúan sobre el grupo terminal, sub-terminal o biterminal del hidrocarburo introduciendo una molécula de oxígeno formando el alcohol correspondiente, posteriormente continúa la oxidación del alcohol por acción de otras enzimas a un aldehído o acetona y finalmente a ácido carboxílico, mientras que dependiendo del sistema se puede llevar la formación de un ácido dicarboxílico, el producto final entra a la β -

oxidación para ser degradado a acetyl-CoA y convertido en fuente de carbono y energía. (Figura 2).

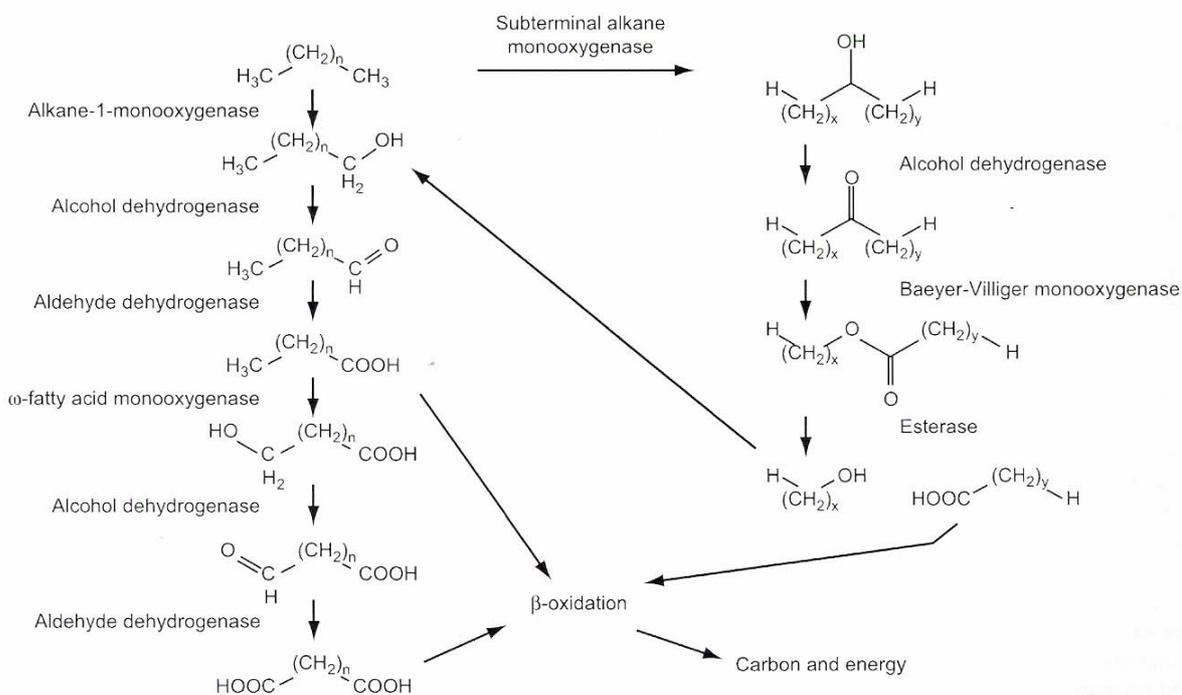


Figura 2. Rutas de oxidación de hidrocarburos alifáticos, terminal, subterminal y biterminal (van Beilen *et al*, 2003).

El principal problema para degradar los hidrocarburos cíclicos, es romper el anillo aromático. Los microorganismos en lugar de utilizar una enzima monooxygenasa específica para cada molécula diferente, utilizan vías bioquímicas llamadas vías altas o periféricas que consisten en modificar los diferentes anillos aromáticos absorbidos, en esta parte puede intervenir una monooxygenasa o dioxigenasa dependiendo del compuesto. La monooxygenasa introduce una molécula de oxígeno en caso de no ser un compuesto susceptible a ser degradado introduce otro oxígeno, produciendo la misma molécula que una dioxigenasa. Las dioxigenasas actúan sobre hidrocarburos aromáticos introduciendo dos moléculas de oxígeno, teniendo un producto en el que actuarán otros sistemas para ser utilizado como fuente de energía y carbono. De esta forma, la gran variedad de compuestos aromáticos que se pueden encontrar son modificados y convertidos a protocatecuato o catecol, a partir de estas

dos moléculas que convergen, todos los compuestos, puede ser convertidos a través del rompimiento del anillo mediante enzimas específicas, esta segunda fase en la degradación, lo que se conoce como vías bajas, formando un producto de más fácil asimilación. (Figura 3).

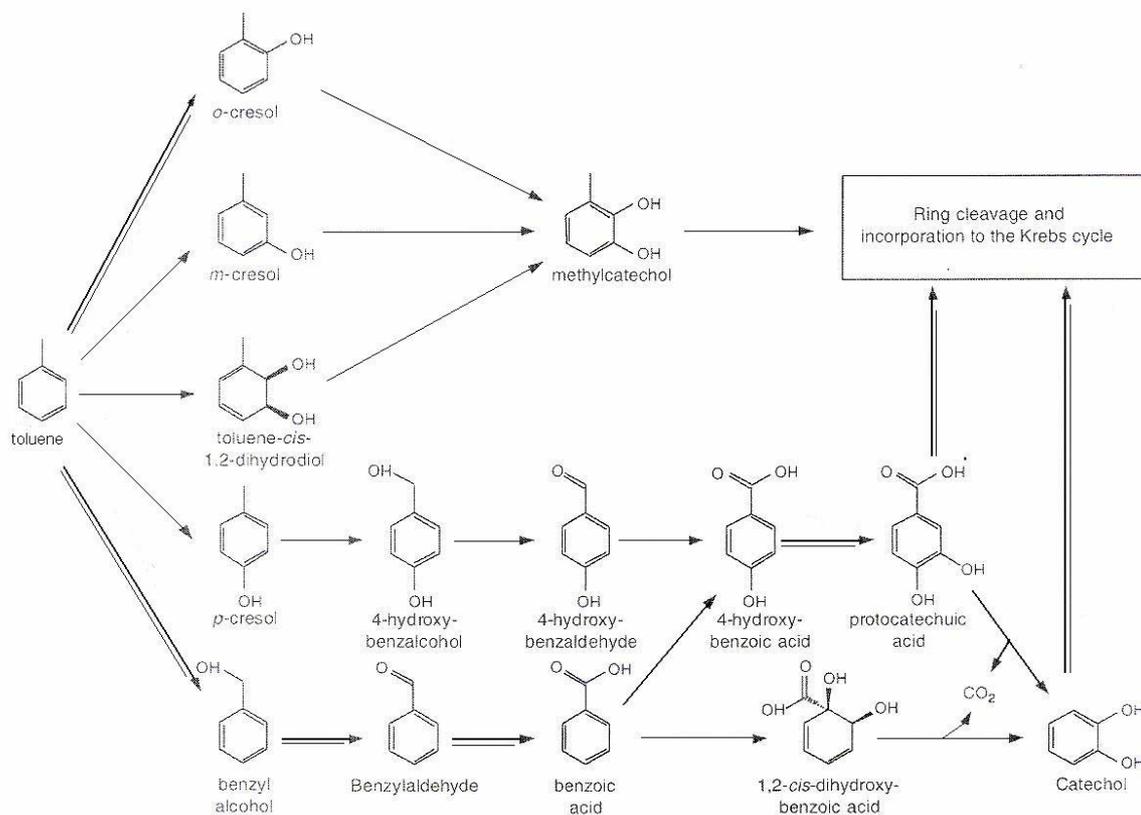


Figura 3. Rutas de degradación aerobia de hidrocarburos aromáticos por hongos (líneas gruesas), bacterias (líneas suaves) [Francesc *et al*, 2005].

Los hongos filamentosos presentan rutas de oxidación similares tanto para hidrocarburos alifáticos como aromáticos a las usadas por bacterias y levaduras (Francesc *et al*, 2005, van Beilen *et al*, 2003, Walker *et al*, 1973). Siendo de mayor interés los hongos para sistemas de eliminación de hidrocarburos como la biofiltración, por su capacidad de colonizar tanto la superficie de líquidos como sólidos, de tal forma que un porcentaje elevado de hifas se encuentra rodeado de aire, aumentando el área de contacto. Una vez que el micelio vegetativo se ha desarrollado, se forman hifas aéreas que abandonan el ambiente hidrofílico para

diferenciarse en estructuras simples o elaboradas que pueden contener esporas. Las hifas aéreas, esporas sexuales y asexuales en la mayoría de las especies son hidrofóbicas. Algunos de los procesos claves involucrados en la formación de hifas aéreas es la secreción de moléculas surfactantes que disminuyan la tensión superficial de los ambientes acuosos capacitándolas para crecer en aire. Estas moléculas en los hongos son proteínas conocidas como hidrofobinas.

Las hidrofobinas son proteínas de bajo peso molecular, 10 kDa, con aproximadamente 100 aminoácidos, caracterizadas por la conservación de 8 residuos de cisteínas que forman puentes disulfuro (Figura 4) con un patrón típico de hidrofobicidad, tales como recubrir la hifa aérea, esporas y cuerpos fructíferos (ejemplo, seta.) Figura 5, la producción es determinada también durante el proceso inicial de la patogénesis de los hongos, los cuales deben crecer sobre la superficie hidrófoba del insecto antes de la penetración para que la infección pueda ocurrir.

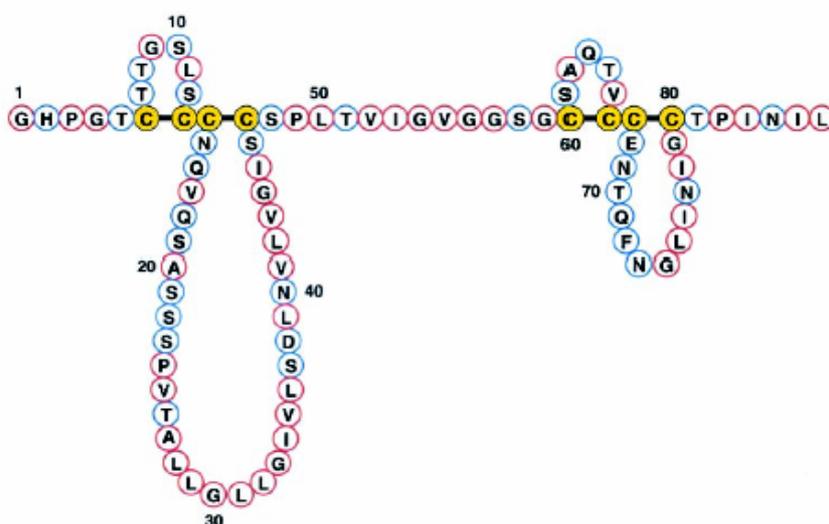


Figura 4. Estructura primaria de la hidrofobina SC3 de *Schizophyllum commune* (Zangi et al, 2002).

Las hidrofobinas se ensamblan en la interfase hidrofóbica/hidrofílica (por ejemplo entre el agua y aire, el agua y aceite, o agua y un sólido hidrófobo) formando una membrana

anfipática, produciendo un cambio de acuerdo a la naturaleza de las superficies (Figura 5) (Wessels, 1994; 1997). Cuando se ensamblan en interfase agua-aire se observa una reducción en la tensión superficial (de 72 mJ/m^2 a 24 mJ/m^2) (van der Vegt *et al*, 1996; Wösten and Wessels, 1997). En forma similar sucede con el aire o un sólido hidrófobo, como la cutícula de los insectos y la pared celular hidrofílica, esta última se recubre con las hidrofobinas orientadas a la pared de los hongos, mientras el lado hidrófobo es expuesto al hospedador.

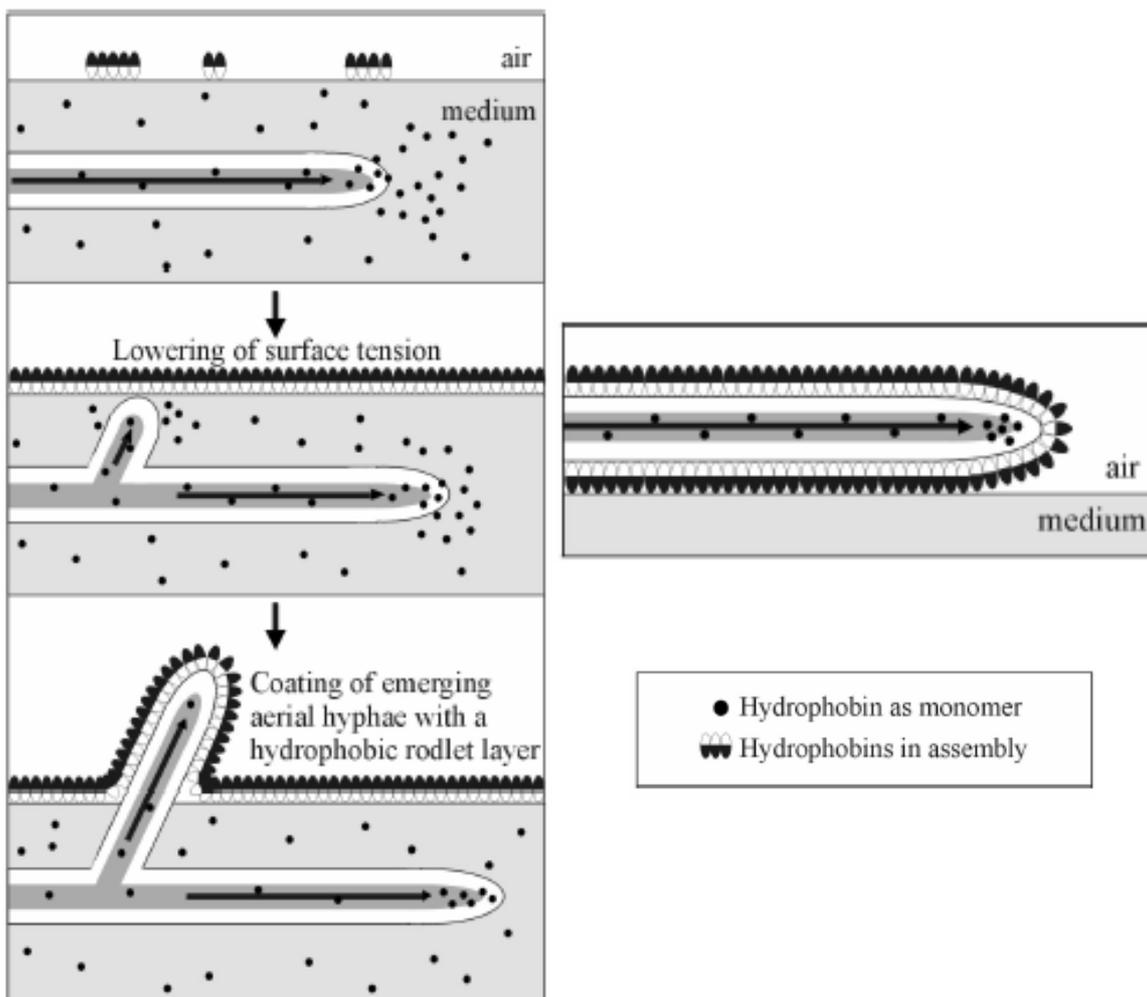


Figura 5. Modelo de la formación de la hifa aérea de hongos filamentosos (Wösten *et al*, 2000, Wösten *et al*, 2001).

Con base en la solubilidad de las películas formadas con hidrofobinas en las interfases, así como las propiedades biofísicas, Wessels clasificó las hidrofobinas como clase I y clase II (Wessels *et al*, 1994). Las hidrofobinas clase I forman películas de proteínas muy estables, insolubles en dodecil sulfato sódico (SDS), incluso resiste los lavados con agua ó 2% de SDS a 100 °C, y sólo puede disociarse con ácido fórmico (FA) o ácido trifluoracético concentrado (TFA). La hidrofobina SC3 de *Schizophyllum commune* (Schuren and Wessels, 1990) es el ejemplo más claro de hidrofobinas clase I (Figura 4). Esta hidrofobina ha sido utilizada como modelo para la identificación de otras hidrofobinas tanto de la clase I como de la II, (Wessels *et al*, 1991; Wösten *et al*, 1993; 1994), Por otra parte, las hidrofobinas clase II forman películas inestables solubles en 2% de SDS o etanol al 60%, ejemplificadas por la hidrofobina cerato-ulmin (CU) de *Ophiostoma ulm* (Richards, 1993; Boowden *et al*, 1994). La mayoría de las hidrofobinas identificadas solo se conocen por la secuencia de su gen, su papel en el crecimiento y desarrollo fúngico han sido elucidados basados en la mutagénesis generando la eliminación o ruptura del gen.

II. ANTECEDENTES.

Muchos de los substratos en los que se desarrollan los hongos son sólidos hidrofóbicos, por ejemplo la cutícula de los insectos. La cual está compuesta de capas de proteína y quitina (Endocutícula y Exocutícula) que están plastificadas con ceras, lipoproteínas (cuticulinas) y materiales de cementación o cimentación (Epicutícula). Los hongos entomopatógenos se caracterizan por realizar un reconocimiento superficial del hospedador, excretando enzimas que permita la penetración de las hifas hasta que finalmente se observa lisis y muerte del hospedador. Estas depolimerasas son proteasas tipo subtilisinas, tripsinas, metaloproteasas y peptidasas, así como varios tipos de enzimas quitinolíticas (Exoquitinasas, Endoquitinasas, Exo-N-Diacetil-Quitobiohidrolasa, N- acetilglucosaminada y N-acetil-D-glucosamina) que actúan después de las proteasas (St. Leger *et al*, 1998). De este género de hongos filamentosos se ha estudiado *Lecanicillium* (anteriormente conocido como *Verticillium*), que se agrupan en especies micoparásitas y entomopatógenas, reconocido como potente productor de quitinasas utilizando quitina como inductor y que es parte del mecanismo de antagonismo (Matsumoto *et al*, 2004), además por su capacidad entomopatógena es de aplicación en biocontrol de plagas.

Los hongos filamentosos se han empleado en sistemas de biodegradación como biofiltros o biorreactores con el interés de mejorar la eliminación de hidrocarburos. Estos sistemas tienen como ventajas con respecto a los hongos, la resistencia a la desecación, tolerancia a pH ácidos, la formación de biopelículas hidrofóbicas que permite que entren más rápidamente y estén en contacto con las hifas teniendo mayor área de contacto. En experimentos realizados con *Scedosporium apiospermum* mostraron una capacidad de eliminación de tolueno en fase gas hasta 8 veces mayor que con las bacterias (García *et al*, 2002). Entre algunos de los géneros de hongos que se ha estudiado su actividad degradadora están *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Verticillium*, entre otros (Francesc *et al*, 2005)

Aunque se han realizado varios estudios para determinar la actividad degradadora por hongos filamentosos, son pocas las pruebas en las que se ha examinado el efecto de la adición de hidrocarburos al medio en las funciones acostumbradas del hongo. Por lo que con la

finalidad de observar el efecto de los hidrocarburos en la actividad entomopatógena, se realizaron cultivos enriquecidos con n-hexadecano, como única fuente de carbono, que provocó una mejoría en su habilidad para matar el gorgojo del frijol, comparado con un control, evidenciando que la adición de alcanos al medio de cultivo podría ser una herramienta para incrementar la virulencia de algunos micoinsecticidas, actividad que fue atribuida a la composición de la membrana de las hifas (Crespo *et al*, 2000, Crespo *et al*, 2002), pero que puede ser relacionada además con aumento de la expresión de las enzimas necesarias para llevar a cabo los procesos entomopatógenos.

Lecanicillium ha sido estudiado en sistemas en medio líquido y sólido, con soportes orgánicos como bagazo de caña (Matsumoto *et al*, 2004) e inorgánicos como poliuretano (Marín *et al*, 2006) con la finalidad de inducir e incrementar la actividad quitinolítica, utilizando quitina como fuente de carbono. Pocos reportes se han realizado sobre la actividad degradadora de hidrocarburos por *Lecanicillium*, Vroumsia *et al*, (1999) reportaron que *Verticillium lecanii* cultivado en ácido 2-4 dicloro fenol en una concentración de 100 mg/l, degradó un 22% de este. Krivobok *et al*, (1998) demostraron que *Verticillium lecanii* es capaz de tolerar concentraciones de 1 a 100 mg de antraceno/ml y degradar 10 mg de antraceno/ml en medio líquido. A pesar de estos estudios, no se han realizado observaciones de actividad entomopatógena, sobre la expresión de enzimas quitinolíticas y el crecimiento de *Lecanicillium* empleando hidrocarburos como única fuente de carbono.

III. JUSTIFICACIÓN.

Se han estudiado diversos factores que afectan la virulencia de hongos entomopatógenos y micoparásitos, tales como: pH, nutrientes, actividad de agua en cultivos sólidos. Dentro de los factores más estudiados se encuentran los nutrientes, nitrógeno y fuentes de carbono utilizándose azúcares, quitina y paredes celulares, por mencionar algunos (Vázquez *et al*, 1998; Olmedo *et al*, 2002; Matsumoto *et al*, 2004; Quijano *et al*, 2004). *Lecanicillium* ha sido poco estudiado en cuanto a su capacidad degradadora de hidrocarburos, sin embargo es reconocido por su actividad micoparásita y entomopatógena, como productores de quitinasas (Matsumoto *et al*, 2004; Shirai, 2004).

En estudios recientes existen reportes en donde se ha crecido *Beauveria bassiana* en medios enriquecidos con hidrocarburos (n-hexadecano) como única fuente de carbono, en los cuales presentó un incremento notorio en la virulencia, los autores observaron una variación en la composición de lípidos de los hongos, encontrando una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (con relación a los saturados) debido a que el hongo no finaliza la β -oxidación (Crespo *et al*, 2000; Crespo *et al*, 2002). Sin embargo, a pesar de que los autores explican que el incremento en la virulencia se debe a la composición lipídica esto no es claro, por lo que requiere investigarse con más detalle. Probablemente, más que por la composición lipídica de la célula fúngica, existe un hecho relevante que es el que la superficie de los insectos está cubierta por ceras que le confieren protección e hidrofobicidad, disparando la expresión de las hidrofobinas, que permite el desarrollarse bajo estas condiciones. Es decir, la hidrofobicidad representa una señal fisiológica que detona otros factores de virulencia como la producción de enzimas, la adaptación y degradación de compuestos hidrofóbicos. Por lo que el propósito de este estudio fue el determinar si en sistemas más hidrofóbicos (hidrocarburos como fuente de carbono) se inducía la expresión de hidrofobinas y quitinasas aún sin la adición de un inductor convencional.

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Determinar el crecimiento y actividad quitinolítica de los hongos en presencia de hidrocarburos y el efecto de estos sobre la expresión de quitinasas.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Seleccionar las cepas de *Lecanicillium* y *Beauveria* capaces de desarrollarse en cultivo superficial y líquido utilizando hidrocarburos como fuente de carbono.
- Determinar el efecto de los hidrocarburos sobre el crecimiento de *Lecanicillium* y la producción de quitinasas.
- Establecer técnicas de extracción de ARN y determinar la expresión de hidrofobinas de *Lecanicillium*.

V. HIPÓTESIS.

La hidrofobicidad del medio representa una señal fisiológica para los hongos entomopatógenos que detona factores de virulencia, como la producción de quitinasas, la adaptación, crecimiento y degradación de hidrocarburos volátiles.

VI. MATERIALES Y METODOS.

VI.1 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos.

VI.1.1 Microorganismos.

Se emplearon cepas del genero de *Lecanicillium* y *Beauveria bassiana* (Tabla 1). Las cepas se mantuvieron en agar de papa y dextrosa a 4°C hasta su utilización.

Tabla 1. Descripción de cepas de *Lecanicillium* y *Beauveria bassiana*.

Cepa/ Clave	Colección	Aislado	Origen
<i>Beauveria bassiana</i> - B.b.	GRC*	No reportada	No reportada
<i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC26854	ATCC ⁺	No reportada	Colección ATCC
<i>Lecanicillium lecanii</i> ATCC46578	ATCC ⁺	No reportada	Colección ATCC
<i>Lecanicillium lecanii</i> 157	GRC*	No reportada	México
<i>Lecanicillium lecanii</i> 974	GRC*	<i>Homoptera: Aphididae</i>	Venezuela
<i>Lecanicillium lecanii</i> 991	GRC*	<i>Bombyx mori.</i> <i>Lepidoptera: Bombycidae</i>	Japón
<i>Lecanicillium lecanii</i> 1029	GRC*	<i>Saissetia oleae Homoptera:</i> <i>Coccidae</i>	Israel
<i>Lecanicillium lecanii</i> 2009	GRC*	<i>Toxoptera citricida Homoptera:</i> <i>Aphididae</i>	Argentina
<i>Lecanicillium lecanii</i> 2149	GRC*	<i>Coccus viridis Homoptera: Coccidae</i>	Indonesia
<i>Lecanicillium chlamydosporium</i> 2218	GRC*	<i>Lagria vilosa Coleoptera: Lagriidae</i>	Brasil
<i>Lecanicillium lecanii</i> 2460	GRC*	<i>Toxoptera citricida Homoptera:</i> <i>Aphididae</i>	Argentina
<i>Lecanicillium lecanii</i> 2832	GRC*	<i>Pseudotsuga-Abies forest</i>	Durango México
<i>Lecanicillium lecanii</i> 2858	GRC*	<i>Macrosiphum euphorbiae</i> <i>Homoptera: Aphididae</i>	EUA Idah
<i>Lecanicillium lecanii</i> 2916	GRC*	<i>Homoptera: Coccidae</i>	Ecuador Islas Galápagos
<i>Lecanicillium lecanii</i> 3909	GRC*	<i>Diuraphis noxia</i> <i>Homoptera: Aphididae</i>	Manipulación en laboratorio (ARSEF 2858)
<i>Lecanicillium fungicola</i> var <i>flavidum</i> 4519	GRC*	Basidiocarpa, <i>Entoloma</i> sp. <i>Agaricales: Entolomataceae</i> micoparásito	EUA
<i>Lecanicillium lecanii</i> 5129	GRC*	Hospedero no identificado, patógeno de trigo, posible micoparásitos	No reportada
<i>Lecanicillium lecanii</i> 5153	GRC*	<i>Coccus viridis Homoptera: Coccidae</i>	Indonesia
<i>Lecanicillium lecanii</i> EH-348	GRC*	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	México
<i>Lecanicillium lecanii</i> EH-457	GRC*	<i>Hemileia vastratix</i> (roya del café)	México
<i>Lecanicillium lecanii</i> EH-458	GRC*	<i>Hemileia vastratix</i> (roya del café)	México
<i>Lecanicillium lecanii</i> EH-459	GRC*	<i>Hemileia vastratix</i> (roya del café)	México
<i>Lecanicillium lecanii</i> EH-460	GRC*	<i>Hemileia vastratix</i> (roya del café)	México

*Genetic Resource Collection, anteriormente International Mycological Institute IMI

+American Type Culture Collection

VI.1.2 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en cultivo sumergido.

VI.1.2.1 Preparación de inóculo.

Las cepas de *Lecanicillium* y *Beauveria* (Tabla 1) fueron cultivadas en agar de papa y dextrosa para la producción de esporas a 25 °C por 4 días. La suspensión de esporas se preparó por agitación con una solución de agua estéril y 0.02% Tween 80 hasta una concentración de 10^3 a 10^8 esporas/ml (Bidochka and Khachatourians, 1988). Se inocularon 5×10^7 esporas/g de sustrato (considerando como sustrato a glucosa, quitina, e hidrocarburos) (Zhu *et al*, 1994, Matsumoto *et al*, 2004).

VI.1.2.2 Conteo de esporas.

El número de esporas se determinó por conteo directo en cámara de Neubauer de 13 cuadros al azar de las 25 cámaras (integradas por 16 cuadros), utilizando la dilución adecuada. La fórmula empleada para expresar el número de esporas obtenido se describe a continuación:

- Número de esporas por ml de suspensión inicial.

$$N = nFD$$

Donde:

N = Número de esporas/ml de suspensión inicial.

n = Promedio del número de esporas contadas en la cámara de Neubauer

F = Factor de la cámara empleada (25×10^4)

D = Dilución empleada para el conteo.

VI.1.2.3 Medio de cultivo líquido para selección de cepas degradadoras de hidrocarburos.

Se utilizó el medio mineral como base a la siguiente composición (g/l): K_2HPO_4 2.80, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.38, $CaCl_2$ 0.48, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22, $(NH_4)_2SO_4$ 7.50, $(NH_4)Cl$ 4.10, NaH_2PO_4

7H₂O 1.67. Las fuentes de carbono fueron de acuerdo a los siguientes tratamientos: Control (g/l): glucosa 25.68, extracto levadura 1.00. Testigo (g/l): n-hexano 10.18, tolueno 1.94, extracto de levadura 1.00. Muestra (g/l): n-hexano 10.18, tolueno 1.94, se ajustó a un pH inicial de 6.0 usando NaOH 1N (los hidrocarburos se adicionaron después de esterilizar el medio de cultivo). Medio que se empleó en la selección de cepas degradadoras en cultivo líquido.

VI.1.2.4 Cultivo de cepas degradadoras de hidrocarburos en medio sumergido.

Se preparó medio de cultivo mineral para cada condición descrita en la sección VI.1.2.3 (sin la adición de hidrocarburos), colocando 100 ml de estos en matraces de 250 ml. Empleando para tal fin matraces con baffles y tapón de algodón (Condición A) y matraces con tapa de rosca (Condición B), una vez cerrados fueron esterilizados (121 °C por 15 min), al enfriar se inocularon con 5×10^7 esporas/g de sustrato en condiciones estériles y se adicionó los hidrocarburos (mezcla de n-hexano y tolueno) según la condición, cerrando el matraz inmediatamente. Los matraces fueron incubados a 25 °C a 180 rpm durante 30 días, realizando observaciones cada 7 días, transcurrido el tiempo de incubación se realizó a cada muestra la determinación de biomasa por peso seco y microscopía óptica.

VI .1.2.5 Medición de biomasa por peso seco de medio sumergido.

El peso seco se obtuvo por la diferencia de pesos de la biomasa extraída en la centrifugación del medio de cultivo y el peso del papel filtro colocado a peso constante (Matsumoto *et al*, 2004).

VI .1.2.6 Microscopia óptica en medio sumergido.

De una muestra homogénea de medio líquido se realizó el procesamiento de imágenes mediante el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Maryland, USA). Las imágenes fueron tomadas aleatoriamente a un aumento de 4X, 10X, 40X, 100X en un microscopio óptico (Olympus BX50, Japón), realizando mediciones de los diámetros de las hifas presentes.

VI.1.3 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en cultivo superficial.

VI.1.3.1 Medio de cultivo superficial para selección de cepas degradadoras de hidrocarburos y productoras de quitinasas.

Se preparó medio mineral de acuerdo a la composición descrita en la sección VI.1.2.3, adicionando agar bacteriológico (15 g/l) y empleando las fuentes de carbono indicadas para cada tratamiento como se describen en la Tabla 2, considerando que los hidrocarburos se adicionaron en el momento de incubación como se describe en la sección VI.1.3.2. Una vez preparados los medios de cultivo para cada tratamiento fueron esterilizados (121 °C por 15 min) y posteriormente se vertieron en caja Petri.

Tabla 2. Tratamientos para la selección de cepas degradadoras de hidrocarburos y determinación actividad quitinolítica.

Tratamiento	Clave	Fuente de carbono (g/l)
1**	MT	tolueno;
2**	MGQT	tolueno, quitina coloidal* 10 y glucosa 3;
3**	MQT	tolueno y quitina coloidal* 10;
4**	MH	n-hexano;
5**	MGQH	n-hexano, quitina coloidal* 10 y glucosa 3;
6**	MQH	n-hexano y quitina coloidal* 10;
7**	MM	mezcla de n-hexano (83%) y tolueno (17%);
8**	MGQM	mezcla de n-hexano (83%) y tolueno (17%), quitina coloidal* 10 y glucosa 3;
9**	MQM	mezcla n-hexano (83%) y tolueno (17%) y quitina coloidal* 10;
10	MQ	quitina coloidal* 10;
11	MGQ	quitina coloidal* 10 y glucosa 3 ;
12	MG	glucosa 3;

* Preparación de quitina coloidal AII.1

** Los medios fueron esterilizados sin los hidrocarburos

VI.1.3.2 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en cultivo superficial.

Las cajas previamente preparadas fueron inoculadas por picadura en el centro, realizando esto para cada tratamiento (Tabla 2), por duplicado, por cada cepa a probar (Tabla 1). A continuación las cajas se colocaron en contenedores herméticos con un tubo con carbón activado, adicionando 1 ml de hidrocarburo (tolueno, n-hexano o la mezcla de tolueno/n-hexano), según el tratamiento, este se adicionó cada dos días. La incubación de las cajas para todos los tratamientos se realizó por 30 días a 25°C, efectuando observaciones cada 7 días. Concluido el tiempo de incubación, se determinó la actividad quitinolítica mediante la medición de halos de hidrólisis de quitina coloidal, crecimiento radial, microscopía óptica y biomasa por peso seco.

VI.1.3.3 Determinación del crecimiento radial y halos de hidrólisis de quitina.

Para determinar el crecimiento radial se midió el diámetro del desarrollo (Figura 6) del microorganismo en la parte posterior de las cajas Petri, realizando tres mediciones. Asimismo se midieron los diámetros de los halos de hidrólisis de quitina coloidal. (Matsumoto *et al*, 2001; Plascencia *et al*, 2003).

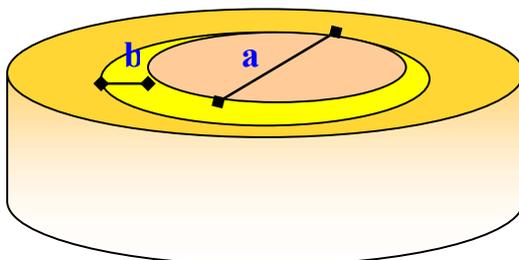


Figura 6. Representación gráfica de mediciones de diámetros de crecimiento radial (línea a) y halo de hidrólisis de quitina coloidal (línea b) sobre agar en cajas Petri.

VI.1.3.4 Determinación de biomasa por peso seco de medio superficial.

El peso seco se obtuvo por la diferencia de pesos de la biomasa extraída a partir del agar derretido y el peso del papel filtro colocado a peso constante (Plascencia *et al*, 2003).

VI .1.3.5 Microscopia óptica en medio superficial.

La caja Petri fue observada aleatoriamente en un microscopio óptico (Olympus BX50, Japón), a aumento de 4X, 10X, 40X, 100X, realizando procesamiento de imágenes mediante el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Maryland, USA), efectuando el procesamiento de imágenes y mediciones de los diámetros de las hifas presentes mediante el software Imagen Pro Plus (Media Cybernetics, Maryland, USA).

VI.1.3.6 Microscopia electrónica.

Las muestras se fijaron por inmersión en solución de glutaraldehído al 5% (v/v) durante 24 horas a 4°C, posteriormente se fijaron con solución de tetraóxido de osmio al 1% (v/v) durante 2 horas a las 4°C. Las muestras ya fijadas se deshidrataron consecutivamente en soluciones de acetona al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% por ultimo se cubrieron con carbono y oro y fueron examinadas en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 KV, Tokio).

VI.2 Determinación de actividad degradadora de hidrocarburos y quitinolítica en microcosmos.

VI.2.1 Medio de cultivo sumergido para microcosmos.

Se utilizó el medio mineral descrito en la sección VI.1.2.3, variando la fuente de carbono según el tratamiento, Control (g/l): quitina coloidal 10, hidrocarburo (tolueno o n-hexano) 5 (µl/10ml); Muestra (g/l): hidrocarburo (tolueno o hexano) 5(µl/10ml); Testigo (g/l): quitina coloidal 10. El pH inicial se ajusto ha 6.0 usando NaOH 1N (los hidrocarburos se adicionaron después de esterilizar el medio de cultivo).

VI.2.2 Fermentación de cepas de *Lecanicillium* para evaluación de actividad degradadora.

Preparados los medios de cultivo mineral: control y muestra (sin la adición del hidrocarburo), fueron esterilizados (121 °C por 20 min), una vez fríos, se vació 10 ml de

medio de cultivo a botellas serológica de 125 ml (estériles), preparando botellas para cada tratamiento a probar (quitina coloidal y tolueno, quitina coloidal y n-hexano, tolueno y n-hexano) y las cepas a evaluar (EH-460, 157 y 2149), realizado por duplicado para cada condición. Las botellas fueron inoculadas con 5×10^7 esporas/g de materia seca y cerradas con válvulas mininert estériles, se inyectó 5 μ l de hidrocarburo según el tratamiento (tolueno o n-hexano) a cada botella serológica e incubó a 25°C y 180 rpm, realizando observaciones durante 80 días de CO₂ e hidrocarburos presentes, al termino de este tiempo, se realizó la determinación de pH, biomasa (proteína total), actividad quitinolítica (endoquitinasas y N-acetil-hexosaminidasa) y azúcares reductores.

VI.2.3 Fermentación de cepa degradadora de hidrocarburos *Lecanicillium lecanii* 2149, para determinación de actividad quitinolítica en función del tiempo.

Considerando la duración de la cinética se preparó medio de cultivo control, testigo y muestra, como se describe en la sección VI.2.1 (sin la adición del hidrocarburo), después de esterilizados (121°C por 20 min) y fríos, se vació 10 ml de medio de cultivo (condiciones estériles) en botellas serológica de 125 ml, preparando botellas serológicas para cada condición (quitina coloidal y tolueno, quitina coloidal y tolueno), que fueron inoculadas con 5×10^7 esporas/g de materia seca de la cepa *Lecanicillium lecanii* 2149, cerrándolas con válvulas mininert estériles. Se inyectó 5 μ l de tolueno a cada botella serológica en la que se indicaba en su tratamiento, las botellas fueron incubadas a 25°C, 180 rpm, durante 26 días, tomando muestras de cada tratamiento diariamente.

De las muestras tomadas se determinó pH, biomasa (proteína total), actividad quitinolítica (endoquitinasas y N-acetil-hexosaminidasa), azúcares reductores.

VI.2.4 Extracto enzimático.

El medio de cultivo fue centrifugado a 11500 rpm a 4°C por 20 min, el sobrenadante obtenido fue considerado el extracto crudo al cual se le determinó: la actividad de endoquitinasas, N-acetil-hexosaminidasa, proteína soluble, azúcares reductores (en aquellas condiciones en que se adicionó quitina coloidal) y pH.

VI.2.5 Determinación de n-hexano o tolueno.

La cantidad presente de hidrocarburo en las botellas serológicas se determinó en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama modelo Hewlett Packard 5890 equipado con una columna de metil silicón de 30 m de largo por 0.25 μm de película y diámetro interno 0.32 μm (Quadrex Corporation). El gas acarreador fue nitrógeno (1.8 ml/min). Las condiciones de operación fueron: columna a 80°C, detector 200°C e inyector 220°C. El volumen de inyección tanto para n-hexano como tolueno fue de 250 μl de gas, las mediciones se realizaron por triplicado para cada botella serológica (Ortiz *et al*, 2003).

VI.2.6 Determinación de CO₂ y O₂.

La emisión de CO₂ se midió por un analizador de gas PID GC (Gow-Mac Instrument Co. Series 580, USA) equipo con una columna de acero de 1/8 pulgadas X 6 pies (Silar 10 C, GRAPAC GC 80/100, Altech, USA) manejando helio (65 ml/min) como gas acarreador. El equipo fue calibrado a cero con el aire de entrada para que la concentración de CO₂ informada corresponda solo al producido por las reacciones biológicas (Ortiz *et al*, 2003). Las condiciones de operación fueron: temperatura de inyección 30 °C, temperatura del horno 40 °C y temperatura del detector 150 °C, la corriente fue de 100 mA. Se inyectó un volumen de 250 μl de gas, realizando la medición por duplicado a cada botella serológica.

VI.2.7 Determinación de parámetros consumo de hidrocarburos y producción de bióxido de carbono para las cepas de *Lecanicillim* EH-460, 157 y 2149.

Para la determinación de los parámetros cinéticos de consumo de hidrocarburos y producción de bióxido de carbono se emplearon los valores calculados en la sección VI.2.5 y VI.2.6 de las cepas *L. lecanii* EH460, 157 y 2149 (Acuña *et al*, 1999):

Estimación de velocidades de consumo de hidrocarburo (n-hexano o tolueno).

Las concentraciones de hidrocarburo (n-hexano o tolueno) determinadas a través del tiempo se ajustaron al modelo lineal (Ecuación 1) siguiente:

$$S = -V_{\max} t + S_{\max} \quad (1)$$

Donde:

S = sustrato presente en el tiempo t (g/m³)

S_{max} = Concentración máxima de sustrato consumido (g/m³) [cuando t → ∞].

V_{max} = velocidad de consumo de sustrato (g/m³•h).

Estimación de velocidades de producción de CO₂.

La velocidad de producción de CO₂ se calculó empleando el modelo de Gompertz (Ecuación 2) utilizando las concentraciones de CO₂ obtenidas durante el tiempo de incubación:

$$P = P_{\max} e^{(-b(e^{-kt}))} \quad (2)$$

Donde:

P = Concentración de producto en el tiempo t (mmol CO₂)

P_{max} = Concentración máxima de producto (mmol CO₂)

k = tasa específica de producción de CO₂ (h⁻¹).

Para la estimación de los parámetros cinéticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, Inc USA), que compara los datos experimentales con los estimados por las ecuaciones 1 y 2.

VI.2.8 Determinación de biomasa.

Las determinaciones del crecimiento de los microorganismos se realizaron mediante la cuantificación de proteína total, que es la sumatoria de proteína soluble e insoluble, las cuales fueron determinadas con la siguiente metodología.

Proteína soluble

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bio Rad, que se basa en la técnica de microensayo de Bradford (1976). El microensayo consistió en tomar una alícuota de 0.8 ml del extracto enzimático (sobrenadante) y adicionar 0.2 ml de reactivo de Bradford, después de agitar suavemente se esperó 5 minutos y se leyó a una absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra). Calculando la concentración de proteína con la ayuda de la curva patrón de seroalbúmina bovina como proteína estándar (Anexo AI.1).

Proteína insoluble

Para determinar la proteína insoluble se pesó 0.2 g de material húmedo (sedimento obtenido de la centrifugación del medio de cultivo) en un tubo de ensaye y se adicionó 5.0 ml de ácido fosfórico (0.15 M). Se agitó vigorosamente y se llevo a ebullición por 7 minutos en baño maría. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm y se realizó el microensayo de Bradford (como se describe en la sección proteína soluble)

Determinación de la velocidad de crecimiento de *Lecanicillium* 2149.

La velocidad de crecimiento se calculó empleando el modelo de Gompertz (Ecuación 3) empleando las concentraciones de CO₂ obtenidas durante el tiempo de incubación:

$$X = X_{\max} e^{(-b(e^{kt}))} \quad (3)$$

Donde:

X = Producción de biomasa en el tiempo t (mg proteína/ml)

X_{max} = Producción de biomasa máxima (mg proteína/ml)

k= tasa específica de crecimiento (h⁻¹).

Para la estimación de los parámetros cinéticos se utilizó el programa estadístico STATISTICA 6.0 (Stat Soft, Inc USA), que compara los datos experimentales con los estimados por la ecuación 3.

VI.2.9 Determinación de actividad de N-acetil-hexosaminidasa.

La presencia de actividad de N-acetil-hexosaminidasa fue determinada en los extractos usando p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) como sustrato. 200μl del extracto enzimático se le adicionaron 200 μl de amortiguador de citratos fosfatos 0.2 M pH 5.6, posteriormente se agregaron 200μl de una solución de 1.0 mg/ml de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (pNAG), se incubó a 37°C durante una hora con agitación (180 rpm). La reacción se paró agregando 1 ml de NaOH 0.02M. La muestra se midió en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra) a 400 nm, para realizar la estimación del p-nitrofenol liberado (Coudron *et al*, 1984), la curva de calibración se muestra en el Anexo AI.2.

Una unidad de actividad enzimática fue definida como “*la cantidad de enzima que libera 1μmol de p-nitrofenol por ml de enzima por minuto bajo las condiciones específicas*” (Tronsmo and Harman, 1993).

VI.2.10 Determinación de endoquitinasas.

La actividad de endoquitinasas fue medida por la reducción de la turbidez de una suspensión de quitina coloidal.

Se mezcló 500 μl de suspensión de quitina coloidal (esta fue preparada de acuerdo al anexo AII.2), con el mismo volumen de extracto enzimático, realizando esto por duplicado, después de agitar la mezcla se incubó por 24 horas a 30 °C y 180 rpm, subsecuentemente fue diluida con 5 ml de agua y leída a la longitud de onda de 510 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra). La actividad fue calculada como el porcentaje de la reducción en la turbidez relativa a una suspensión similar que contiene agua en lugar del extracto que contenía la enzima.

Una unidad de enzima (U) fue definida como “*la cantidad de enzima requerida para reducir la turbiedad de una suspensión de quitina en un 1%*” (Tronsmo *et al.*, 1993).

VI.2.11 Determinación de azúcares reductores (DNS).

En un tubo de ensayo se colocaron: 1 ml de muestra (sobrenadante) y 1 ml de reactivo de DNS (Anexo A.3). Esta mezcla fue calentada a baño María durante 5 minutos parando la reacción con hielo o al chorro de agua fría. Una vez frío, se adicionaron 8 ml de H₂O, después de agitar vigorosamente se procedió a leer su absorbancia a 475 nm en el espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra). Se utilizó N-acetil glucosamina como azúcar estándar con la que se realizó una curva de calibración (Anexo AII.3).

VI.3 Estandarización de técnicas para determinar la expresión de hidrofobinas.

Para determinar la presencia de hidrofobinas, se seleccionó a *Lecanicillium lecanii* 2149, porque presentó actividad degradadora de hidrocarburos (n-hexano o tolueno) en medio sumergido (VII.1 y VII.3), preparando una suspensión de esporas como se describe en la sección VI.1.2.1 (esporas no aclimatadas a hidrocarburos).

VI.3.1 Medios de cultivo para determinar la expresión de hidrofobinas.

En un matraz de 250 ml se colocaron 100 ml de medio mineral (VI.1.2.3) empleando la fuente de carbono según la condición: Control **A** (g/l): extracto de levadura 1 y fructosa 8; Control **B** (g/l): extracto de levadura 1 y glucosa 10; Muestra (g/l): tolueno 11.23 (el hidrocarburo fue adicionado después inocular el medio), ajustando a un pH inicial de 6.0 usando NaOH 1N y fueron esterilizados a 121 °C por 15 min. Los medios de cultivos fueron inoculados con 5×10^7 esporas/g de sustrato e incubados a 25 °C y 180 rpm, por 7 días (Control) ó 30 días (Muestra). Los medios Control fueron utilizados para la estandarización de las técnicas para determinar la expresión de hidrofobinas. (Askolin *et al*, 2001; Calonje *et al*, 2002; Linder *et al*, 2002).

VI.3.2 Extracción de ARN

Concluido el tiempo de incubación (7 días) de *L. lecanii* 2149 en medio de cultivo líquido, se separó la biomasa mediante centrifugación (J-300, Sol-Bat, México) a 3,000 rpm, utilizando tubos estériles.

Se colocó 0.5 g de biomasa extraída en un mortero estéril y previamente tratado con los inhibidores de RNAsas, DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma) y RNAPap® (Ambión), y se le adicionó nitrógeno líquido para la maceración, hasta que la biomasa fue pulverizada. Posteriormente, sin dejar que se descongelara se adicionó 1 ml Trizol (Invitrogen®), formando una mezcla y se continuó con la maceración hasta que el Trizol se incorporó perfectamente. El homogenizado fue transferido a un tubo estéril de 1.5 ml conteniendo perlas de vidrio estériles hasta la marca de 0.25 ml (425 a 600 microns, lavadas con ácido), el tubo se agitó en Vórtex por 15 seg e inmediatamente se colocó en hielo durante 15 segundos, repitiendo este paso 8 veces, manteniéndolo por 5 min más en hielo y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado en un tubo estéril de 1.5 ml y se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó por 20 segundos, se incubó por 3 min en hielo y se centrifugó a 12,000 g (Microcentrífuga Beckman GS-15R, USA) durante 15 min a 4°C. La fase superior acuosa fue transferida a un tubo nuevo y estéril de 1.5 ml y se repitió el paso anterior. El sobrenadante fue colectado en un tubo estéril y se le añadieron 250µl de isopropanol y 250 µl de la mezcla de citrato de sodio 0.8 M/cloruro de sodio 1.2 M, se mezcló por inversión, se incubó por 10 min en hielo, se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C, desechando el sobrenadante. El precipitado (ARN) fue lavado con 1 ml de etanol al 75% (v/v) en H₂O-DEPC (0.1% v/v) recién preparado y frío, agitando hasta desprender el pellet del fondo del tubo, fue centrifugado a 10,000 g por 10 min a 4°C. Se eliminó el etanol con una pipeta Pasteur, con la punta adelgazada, conectado al vacío. El precipitado que contenía el ARN se resuspendió en 500 µl de agua bidestilada con DEPC estéril, 500 µl buffer de LiCl (LiCl 4M, Tris/HCl 20mM, EDTA 10mM) y se dejó precipitar por 1 hora a -20°C, después se centrifugó a 12,000 g, por 10 min a 4°C. El precipitado obtenido se lavó nuevamente con etanol al 75 % (v/v) en H₂O-DEPC, repitiendo el procedimiento anterior. La pastilla de ARN resultante se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada (H₂O_{dd}) con DEPC estéril y 1 µl de RNA sin inhibidor de RNAsas (Invitrogen). La mezcla final fue guardada a -70°C hasta su utilización.

VI.3.2.1 Determinación de la integridad de ARN.

Una vez extraído el ARN, se procedió a visualizarlo por electroforesis en geles de agarosa al 1% (preparación Anexo AII.4). Una alícuota de ARN extraído (5 μ l) se colocó en un tubo estéril de 0.2 ml y se le adicionaron 5 μ l de agua con DEPC estéril y 10 μ l de FMF (Solución desnaturalizante que contiene formamida; solución MOPS [ácido 3-N-Morpholino propanén sulfónico], formaldehído y agua destilada con DEPC estéril) se incubó a 75 °C por 5 min, después, se sumergió en hielo por 1 min. A esta mezcla se le adicionó 2 μ l de solución de carga para ARN (LB) y 0.25 μ l de bromuro de etidio (1 μ m/ μ l), después de resuspendida la muestra, se colocó en los pozos de gel de agarosa. El gel se corrió a 75 volts durante 1.5 horas y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta, captando la imagen en un analizador de imágenes Gel Logic 200 (Kodak), para observar la integridad del ARN extraído.

VI.3.3 Reacción de retrotranscripción (RT)

Con la finalidad de generar los ADN complementarios (cADN) de los ARN mensajeros obtenidos la extracción del ARN, se realizó la retrotranscripción con el estuche comercial Super ScriptTM First-Stand Syntesis System for RT-PCR (Invitrogen®). El procedimiento se describe a continuación brevemente:

En un tubo de 0.2 ml se adicionaron de 50 a 150 ng de la solución del RNA extraído, 1 μ l de dNTP'S al 10 mM de cada uno, dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 1 μ l de oligo (dT) 12-18 (0.5 μ g/ μ l) y 10 μ l de agua con DEPC, se incubó la mezcla por 5 min a 65°C, transcurrido el tiempo el tubo se incubó en hielo por 1 min, después se adicionó una mezcla de 2 μ l de buffer de RT(250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 60 μ l 200 μ l), 2 μ l de MgCl₂ (50 mM), 2 μ l de 0.1 M DTT (Dithiothreitol) y 1 μ l de RNasa OUT (40 U/ μ l). Después se incubó a 42°C por 2 minutos y se adicionó 1 μ l de la enzima retrotranscriptasa Super Script II RT (SSII) se incubó a 42°C por 50 min, después por 15 min a 70°C y finalmente 2 min a 94 °C. Al término de la reacción se colocó en hielo. El producto fue guardado a -70 °C hasta ser utilizado.

VI.3.3.1 Determinación de cADN

Una vez realizada la retrotranscripción (RT) se procedió a visualizar la integridad del producto (cADN) en un gel de agarosa al 0.8%. Se preparó el gel de agarosa como se describe en el Anexo AII.5. A continuación, en un tubo se depositaron 4 µl de producto de RT y se mezcló con 1 µl de solución de carga para ADN. En el primer carril del gel de electroforesis se depositaron 5 µl de marcador de alto peso molecular (1 kb) con solución de carga para ADN (LB) y en el siguiente carril se colocó la mezcla preparada en el tubo.

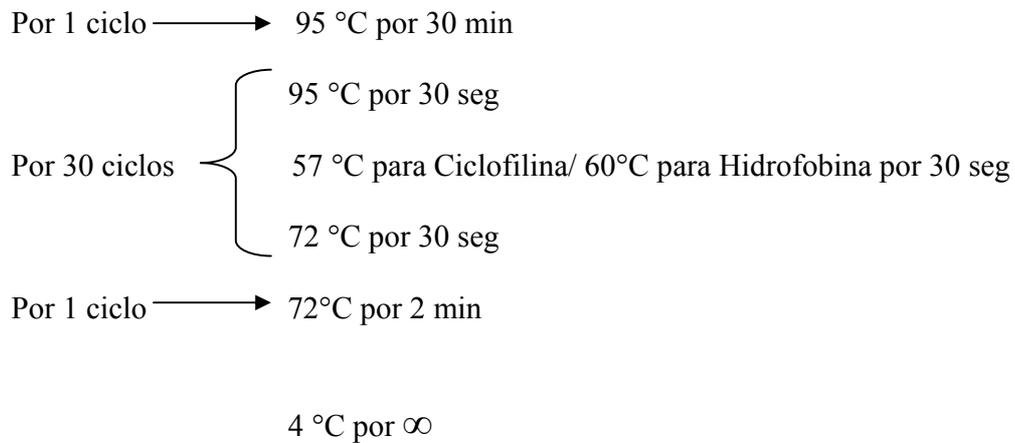
La electroforesis se realizó a 80 volts por 1 hora, hasta que el marcador más pesado del LB recorriera 2/3 partes del gel. Pasado este tiempo, el gel se incubó en una solución de bromuro de etilo (1µm/µl) durante 3 min y en agua estéril por un minuto, después se observó en un transiluminador de luz ultravioleta, para observar la integridad del cADN, captando la imagen en un analizador de imágenes Gel Logia 200 (Kodak).

VI.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de las muestras de cADN se llevó a cabo con reactivos del estuche comercial Super Script™ First-Stand Syntesis System for RT-PCR (Invitrogen®). El procedimiento se siguió de acuerdo a las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones, empleando secuencias de ADN (cebadores), del gen de ciclofilina como gen de normalización) y la secuencia del gen que codifica a la hidrofobina SC3 para la identificación de hidrofobinas en el hongo *Lecanicillium* (Anexo AII.6).

VI.3.4.1 Amplificación del gen que codifica a la hidrofobina SC3 de secuencias de ADN.

En un tubo cónico estéril, de 0.2 ml, se depositaron 5 µl de producto de RT (cADN), 5 µl de Buffer de de la solución amortiguadora PCR, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 1.0 µl dNTP's mix, 0.3 µl de oligo Up, 0.3 µl de oligo Low y H₂O dd hasta un volumen final de 50 µl. Después de mezclar perfectamente el tubo se colocó en un termociclador con el siguiente programa:



Una vez terminada la amplificación el producto se guardó a -70 °C hasta su utilización.

VI.3.4.2 Análisis de los productos de PCR.

En un vial de 0.2 se colocaron 10 µl del producto de PCR y 1 µl de amortiguador de carga para ADN. Una vez listo el gel de electroforesis al 1.2% (método de preparación Anexo AII.5), se depositó en el primer carril 5 µl de marcador de peso molecular (escalera de 100 pb) con amortiguador de carga, en los siguientes carriles (carril ancho) se adicionaron las mezclas de los productos de PCR. Cerrada la cámara se corrió el gel a 75 volts por 1.5 horas. Pasado este tiempo, el gel se incubó en una solución de bromuro de etilo (0.5µm/ml) durante 3 min y en agua estéril por un minuto, después se observó en un transiluminador de luz ultravioleta, para observar la amplificación y el peso del producto de PCR (ADN), captando la imagen en un analizador de imágenes Gel Logia 200 (Kodak).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

VII.1 Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en medio sumergido.

Después de incubar las cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* (Tabla 1) por 30 días en medio mineral a 25°C y 180 rpm, variando la fuente de carbono según el tratamiento: control (glucosa y extracto de levadura), testigo (mezcla de hidrocarburos y extracto de levadura) y muestra (mezcla de hidrocarburos). Empleando como mezcla de hidrocarburos n-hexano y tolueno en una relación de 83% y 17% respectivamente (VI.1.2.3), esto se realizó utilizando tanto la condición A (matraces con baffles y tapón de algodón) como la B (matraces con tapón de rosca). Se determinó biomasa por peso seco y micrografías para la medición de los diámetros de las hifas, con la finalidad de ver las cepas que presentaron mayor crecimiento en medios con hidrocarburos (n-hexano y tolueno) y las variaciones en la morfología de los hongos (VI.1.2.4 y VI.1.2.4).

Entre las observaciones que se pudieron realizar, las cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* que se emplearon son capaces de desarrollarse en medio mineral enriquecido con la mezcla de n-hexano y tolueno, mostrando tolerancia a los hidrocarburos utilizados. Los microorganismos cultivados en la condición A (matraz con baffles y tapón de algodón) crecieron más, esto puede atribuirse a la disponibilidad de oxígeno. El tipo de matraz mejoró la agitación del medio de cultivo, en cuanto el tapón no limitó el oxígeno en el medio en comparación a la condición B. Estas observaciones podrían explicar que las diferencias de biomasa (Figura 7) se deben a la disminución del efecto inhibitorio del hidrocarburo y al aumento del oxígeno disponible. Lo anterior en virtud a que el oxígeno es requerido para iniciar la oxidación y degradación del hidrocarburo (van Beilen *et al*, 2003, Francesc *et al*, 2005). Considerando que n-hexano es menos soluble en agua y más volátil que el tolueno (Arriaga *et al*, 2005), se puede suponer que fue mayor la concentración de tolueno en el medio de líquido.

Con el fin de mejorar la capacidad degradadora de hidrocarburos de hongos o bacterias, en otros estudios (Vroumsia *et al*, 1999; Ronit *et al*, 1996), se enriqueció el medio de cultivo con una segunda fuente de carbono de más fácil asimilación (glucosa, extracto de levadura,

etanol), suficiente para reducir la fase lag y acelerar el crecimiento. Para tal fin se adicionó al medio mineral extracto de levadura, comparando la biomasa extraída de las diferentes cepas de los medios en que se agregó la mezcla de n-hexano y tolueno, se observó que empleando la condición B se tuvo un incremento de 0 a 65% en la producción de biomasa mientras que en la condición A el aumento se determinó entre un intervalo de 21 a 120% (Figura 7).

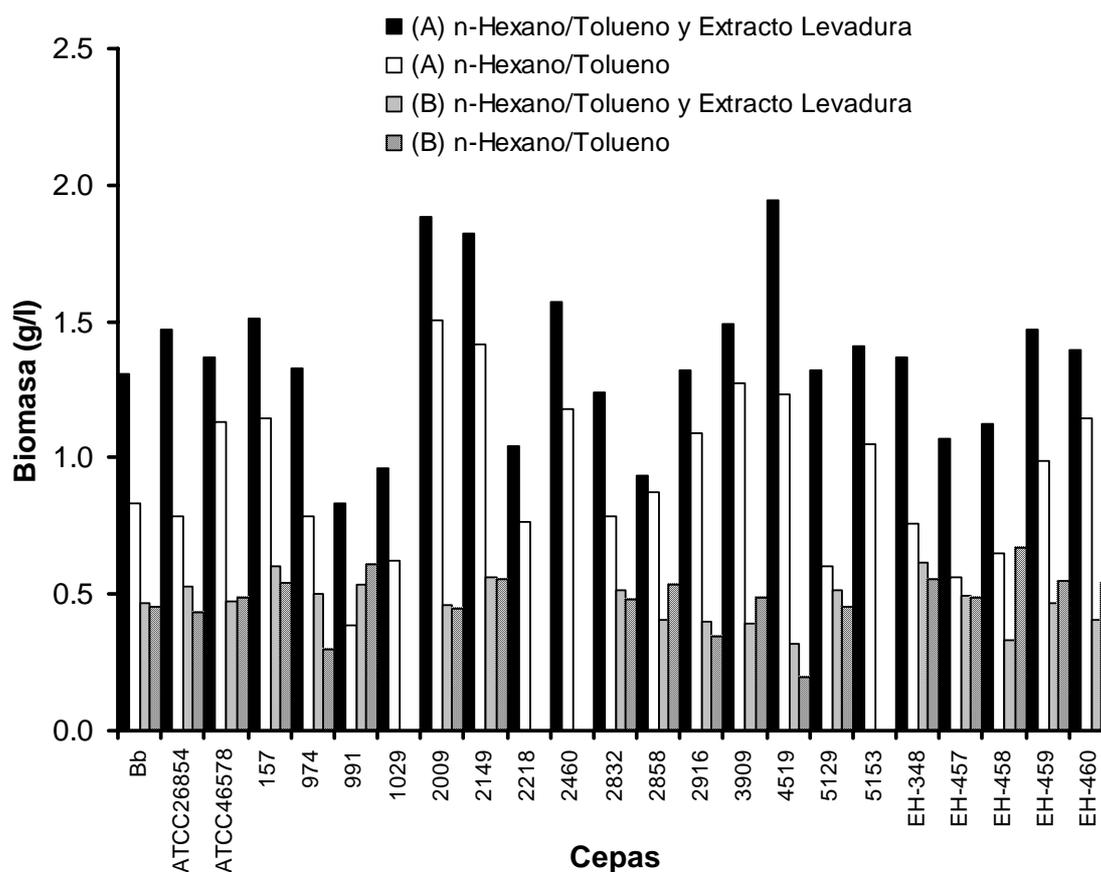


Figura 7. Biomasa determinada por peso seco de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en cultivos sumergidos con medio mineral y la mezcla de hidrocarburos (n-hexano y tolueno), con o sin la adición de extracto de levadura. (A) Matraces con baffles y tapón de algodón y (B) Matraces con tapón de rosca.

Comparando el crecimiento se halló que las cepas de *Lecanicillium* en la condición A con el medio testigo (extracto de levadura y mezcla de hidrocarburos) tuvieron el mayor crecimiento, siendo las mejores cepas *Lecanicillium* 4519 (1.95 g/l), 2009 (1.88 g/l) y 2149

(1.82 g/l). Para la misma condición con el medio muestra (mezcla de hidrocarburos) fueron las cepas *L. lecanii* 2009 (1.50 g/l), 2149 (1.42 g/l) y 3909 (1.27 g/l) las que tuvieron mayor biomasa en este tratamiento. En cuanto a la condición B el mejor crecimiento con el medio testigo lo presentaron las cepa EH-348 (0.61 g/l), 157 (0.60 g/l) y 2149 (0.56 g/l), y empleando el medio muestra con la misma condición fueron *Lecanicillium* EH-459 (0.67 g/l), 991 (0.61 g/l) y 2149 (0.55 g/l), Figura 7.

A partir de las mediciones de peso seco, se puede decir que *L. lecanii* 2149, fue capaz de crecer en medios con la mezcla de hidrocarburos con o sin extracto de levadura, indicando que es tolerante a la presencia de n-hexano y tolueno, además de tener capacidad para degradar al menos uno de los dos hidrocarburos de la mezcla (Figura 7). Examinando el desarrollo del hongo en la condiciones A y B, se observa la presencia de hifas delgadas, en la condición A hubo mayor desarrollo del hongo y menor numero de esporas no germinadas que en la B (Figura 8).

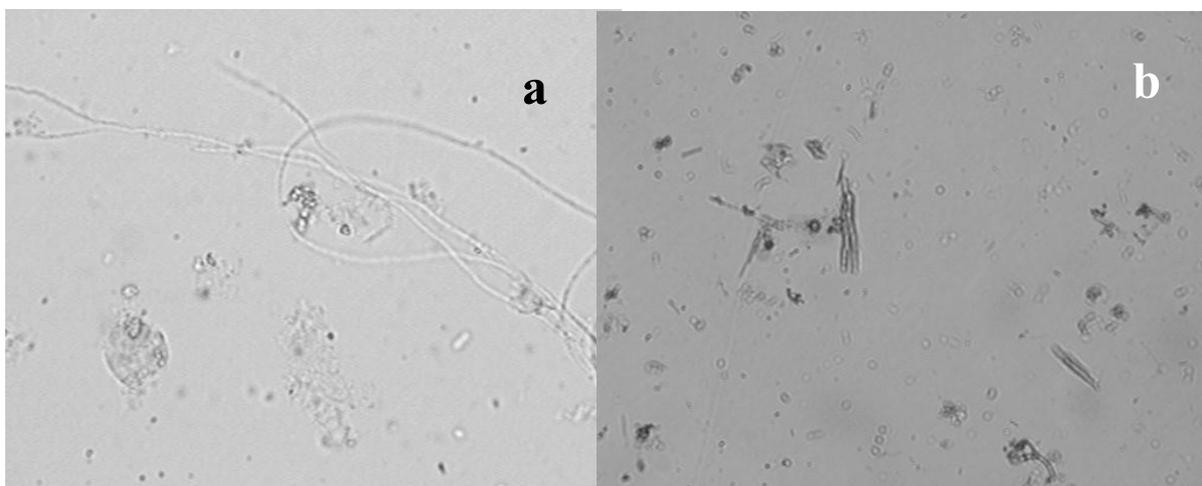


Figura 8. Micrografías a 40x de *Lecanicillium* 2149 en medio mineral con mezcla de n-hexano y tolueno a 25°C y 180 rpm, empleando la condición: a) matraz con baffles y tapón de algodón; b) matraz con tapa de rosca.

Debido a que la condición A favoreció el desarrollo de las 23 cepas probadas, se realizó el análisis de los diámetros de las hifas en esta condición con los medios: control, testigo y

muestra, con el fin de observar el efecto de la mezcla de hidrocarburos sobre la morfología de los hongos. Las cepas crecidas en el medio de cultivo con la mezcla n-hexano y tolueno tuvieron un crecimiento en aglomerados, hifas más delgadas con un mayor número de esporas no germinadas que en el medio control (Figura 9).

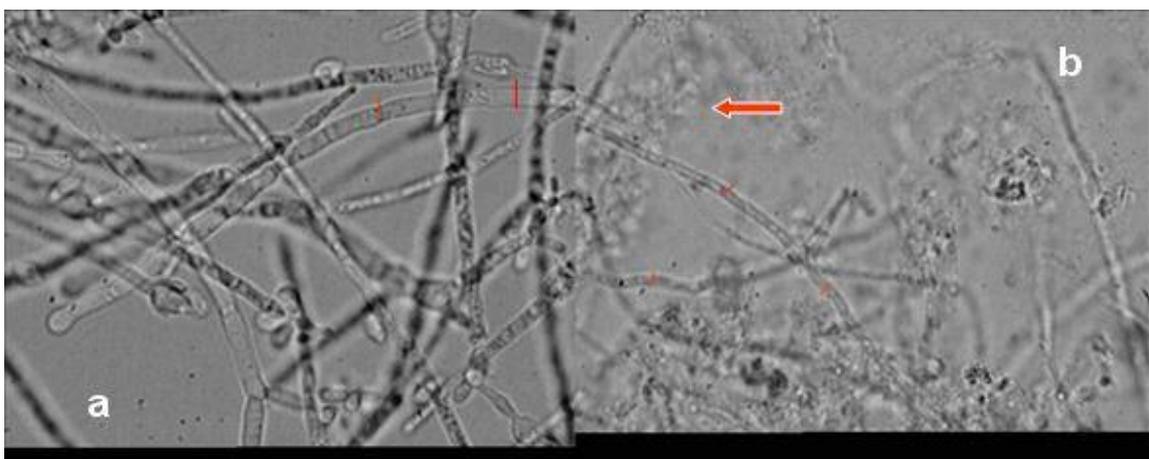


Figura 9. Micrografías a 100x de *L. lecanii* 2149 creciendo a 25°C y 180 rpm, en medio mineral líquido en matraces con baffles y tapones de algodón: a) glucosa y extracto de levadura (control); b) n-hexano y tolueno.

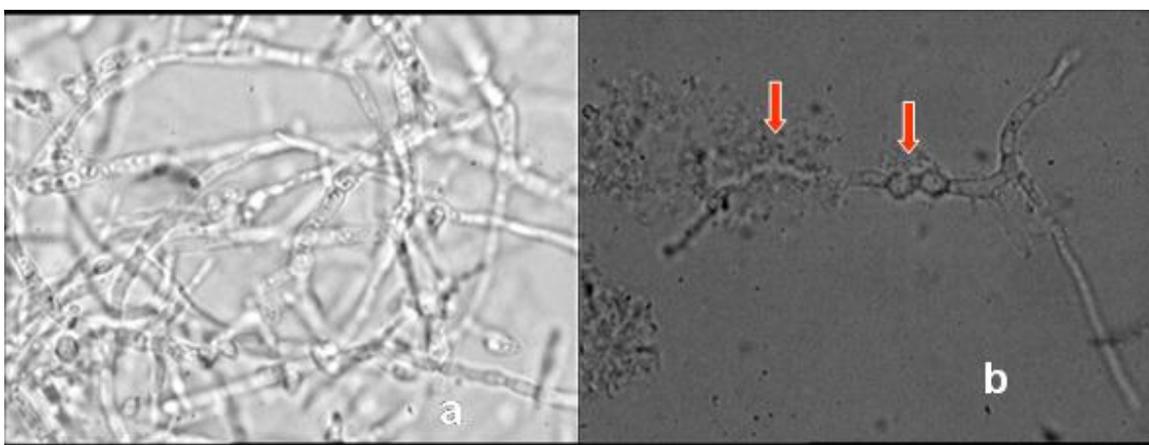


Figura 10. Micrografías a 100x de *Lecanicillium* 991 a 25°C y 180 rpm en medio mineral líquido en matraces con baffles y tapones de algodón: a) glucosa y extracto de levadura (control); b) n-hexano y tolueno.

Se ha reportado que el tipo de fuente de carbono es uno de los factores que modifican la morfología del hongo (Papagianni, 2004). Anteriormente Alba *et al*, (2003) identificaron

cambios morfológicos microscópicos en *S. brevicaulis* crecido en medio líquido con disolventes como única fuente de carbono (tolueno, acetona, isopropanol y xileno), observando abundante y extenso crecimiento micelial, presentando conidios en cadenas pequeñas. Cundell *et al*, (1976) reportaron que *P. chrysogenum* al crecer en medio líquido con hexadecano como fuente de carbono formó aglomerados de forma irregular, comportamiento semejante al observado en *Lecanicillium*.

En cepas más sensibles a los hidrocarburos, fue evidente daño en las paredes celulares de las hifas en comparación con aquellas observadas en los medios con glucosa (Figura 10), presentando una disminución (> 50%) en el diámetro de las hifas (*Lecanicillium* 991 o 974).

Analizando las mediciones de diámetros de hifas se notó una diferencia significativa en función de la fuente de carbono (Tabla AIII.2). Los hongos que crecieron en medios de cultivo con la mezcla n-hexano y tolueno como única fuente de carbono poseyeron diámetros más pequeños al control. Siendo las cepas de *Lecanicillium* EH-460 (1.36 μm) EH-457 (1.42 μm) y 1029 (1.47 μm) las presentaron los máximos diámetros en medio con la mezcla de hidrocarburos, en tanto el mayor daño lo tuvieron las cepas 5129, EH-348 y EH-458 (Figura 11, Tabla AIII.3), indicando que estas fueron menos tolerantes a los hidrocarburos y la adaptación fue más lenta.

La utilización del extracto de levadura como segunda fuente de carbono en medios con mezcla de hidrocarburos (n-hexano y tolueno) aminoró en general el efecto inhibitorio, presentando un daño menor en las hifas y diámetros mayores. También tuvo mayor cantidad de biomasa, aunque no se halló en las cepas correlación entre los diámetros de las hifas y la biomasa producida (Figuras 7 y 11). Las cepas con mayor diámetro de hifas fueron: 3909 (1.60 μm), 2858 (1.53 μm) y 1029 (1.50 μm), mientras el menor diámetro lo presentaron las cepas de *Lecanicillium* 991, 2009 y 5153. (Tabla AIII.4).

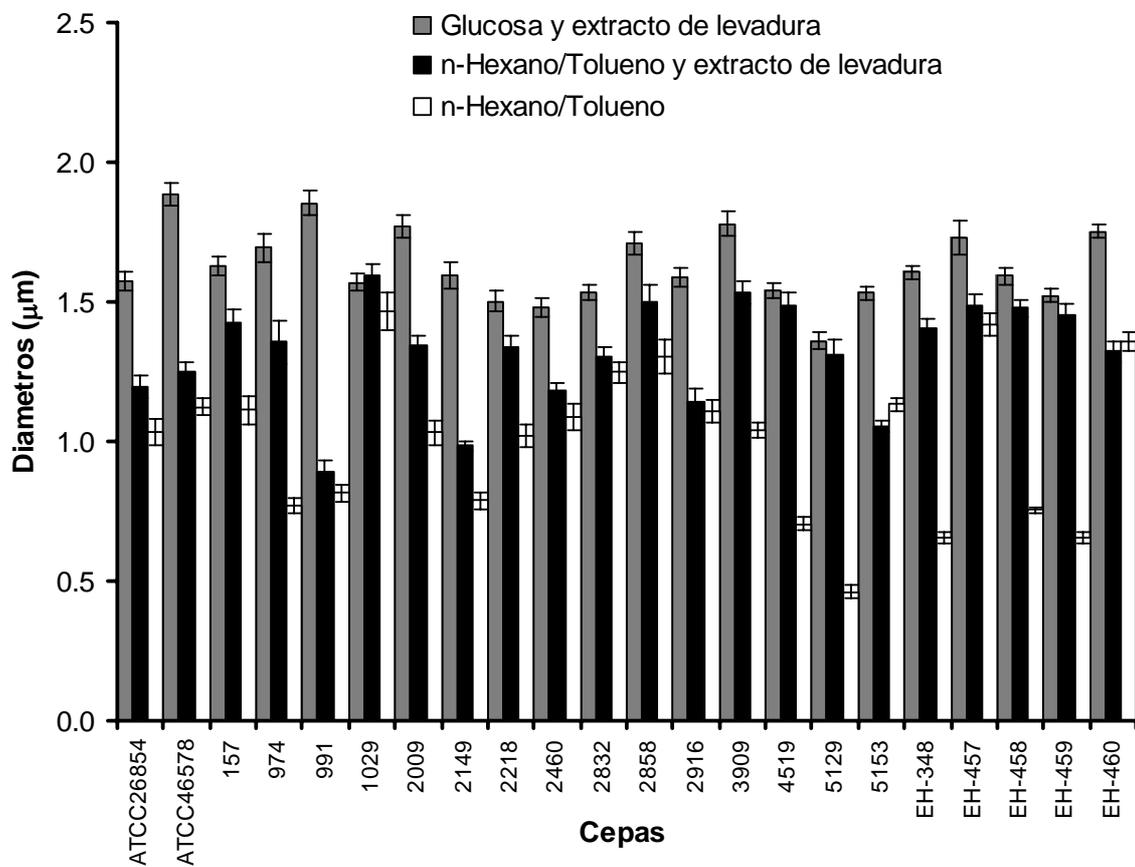


Figura 11. Diámetro de las hifas de *Lecanicillium* y *B. bassiana*, en medio mineral, variando la fuente de carbono, en matraces con baffles y tapón de algodón medidas en micrográficas a 100x. Datos promedio de 70 observaciones y error estándar de la media.

Las hifas de *Lecanicillium* de los medios con hidrocarburos con o sin extracto de levadura mostraron una disminución significativa en el diámetro de las hifas (Tabla AIII.2) con respecto al medio control, por la presencia de la mezcla de n-hexano y tolueno. La formación de diámetros más pequeños de hifas puede deberse al efecto inhibitorio que provoca los hidrocarburos en el desarrollo del hongo, al cambió en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos obtenidos de la degradación de los hidrocarburos, modificando la composición de la pared celular (Papagianni, 2004; Funtikova and Mysyakina 2003). Crespo *et al*, (2002) describieron que *Beauveria bassiana* al crecer en n-hexadecano presentó un cambió en la

proporción de ácidos grasos insaturados/saturados (4.32 a 2.47) de la hifa. En tanto la deformación de las hifas puede deberse a la acumulación de los hidrocarburos en las paredes, los cuales al no transformarse en compuestos más hidrofílicos comienzan a dañar la membrana, dando paso a la deformación de las hifas.

Comparando el crecimiento y los diámetros de las hifas se tiene una correlación en función de la fuente de carbono. A menor diámetro de hifas, menor crecimiento (*L. lecanii* 5129) y menor disminución del diámetro de la hifa, mayor producción de biomasa (*L. lecanii* EH-460).

VII.2 Selección de cepas en medio superficial.

Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en medio superficial.

Con la finalidad de evaluar el crecimiento y el efecto de n-hexano y tolueno sobre la morfología de los hongos, tanto por separado como en mezcla, se crecieron las 23 cepas en medio superficial por 30 días a 25°C, a las cuales se les realizó mediciones de crecimiento radial, halos de hidrólisis de quitina coloidal, micrografías para medición de diámetros de hifas y biomasa por peso seco. Se utilizó, glucosa como control para los tratamientos con n-hexano, tolueno o la mezcla de ambos.

Se observó empleando la mezcla de hidrocarburos que el crecimiento se extendió sobre la mayor parte de la superficie de la placa, con un micelio disperso, escaso y ramificado (e.g. *Lecanicillium* 157); tanto con tolueno o n-hexano puros, en general para todas las cepas, se notaron menores crecimientos radiales en comparación con el control o la mezcla de hidrocarburos; el micelio se encontraba en aglomerados y espesó. Siendo significativamente mayor el diámetro empleando tolueno (Tabla AIII.6). Presentando el mejor crecimiento radial en presencia de tolueno fueron las cepas 157 (6.00 mm), 2916 (6.00 mm) y 5129 (5.42 mm); y con n-hexano *Lecanicillium* 991 (4.58 mm), EH-457 (3.83 mm) y EH-460 (3.83 mm), Tabla AIII.7. En cuanto qué empleando la mezcla de hidrocarburos un 70% de las cepas cubrió la superficie del medio (52 mm), Figura 12.

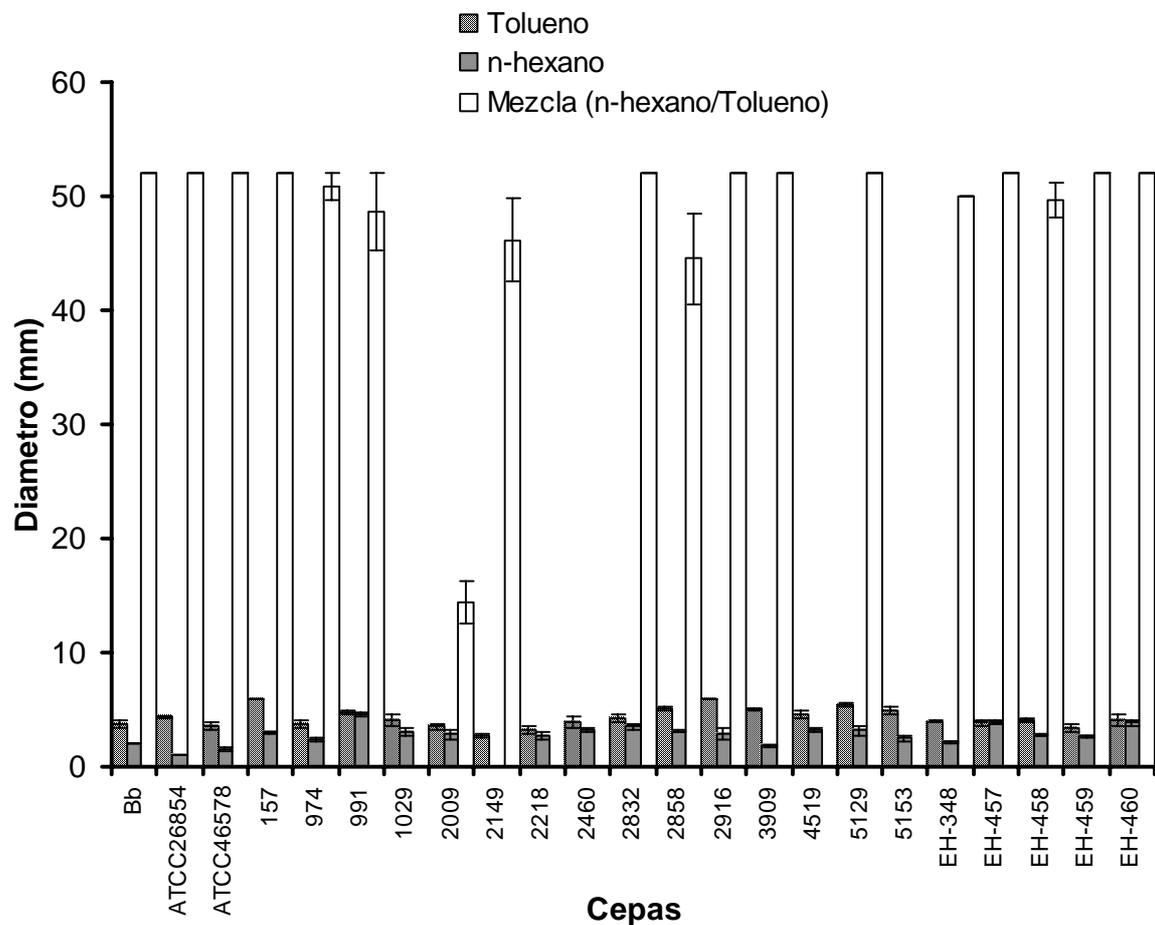


Figura 12. Crecimiento radial de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en medio mineral con n-hexano y/o tolueno como fuentes de carbono, a 25°C. Datos promedio de 6 observaciones y error estándar de la media.

Krivobok *et al*, (1998) cultivaron en medio superficial a *Verticillium lecanii* (conocido ahora como *Lecanicillium lecanii*) utilizando diferentes concentraciones de antraceno como fuente de carbono. Los autores observaron que al incrementar la concentración hasta ser inhibitoria, el crecimiento disminuía con la aparición de un micelio estéril y aglomerado. Comportamiento similar al observado en este trabajo en los medios con n-hexano o tolueno. En tanto, la formación de micelio disperso en el medio con la mezcla de hidrocarburos puede estar relacionada con las características físicas del hidrocarburo como la volatilidad, siendo n-hexano más volátil que tolueno, el ambiente es saturado en mayor proporción por n-hexano;

considerando que el crecimiento radial de los medios con hidrocarburo puro, la formación del micelio disgregado puede deberse a la forma en que el hongo se adaptó para tomar al hidrocarburo de más fácil degradación.

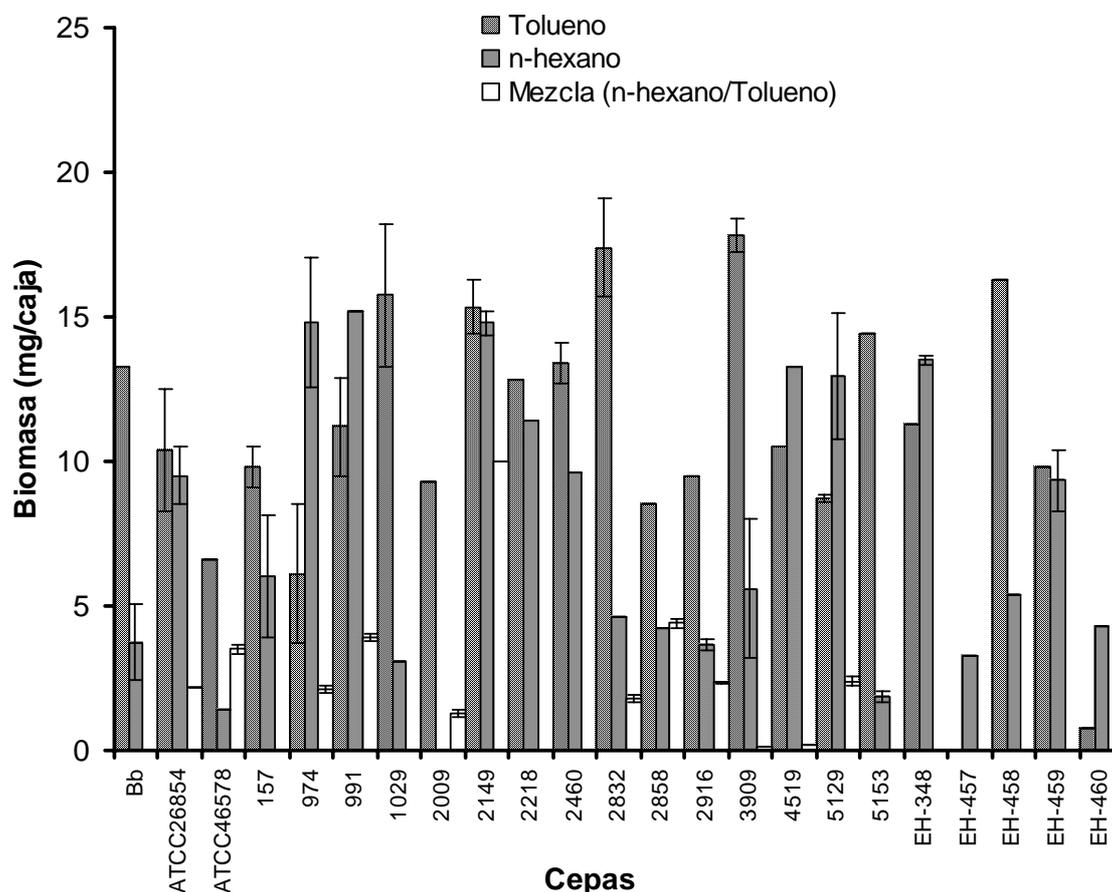


Figura 13. Biomasa de *Lecanicillium* y *B. bassiana* de medio mineral con n-hexano y/o tolueno como fuente de carbono, a 25°C. Datos promedio de 2 observaciones y error estándar de la media.

La producción de biomasa en medios con hidrocarburos fue 14 veces menor que con glucosa (control). Entre las medias de producción de biomasa de los medios con hidrocarburos no se determinó diferencia significativa (Tabla AIII.8). Las cepas con mejor crecimiento en presencia de la mezcla de hidrocarburos fueron *Lecanicillium* 2149 (10.0 mg/caja), 2858 (4.4 mg/caja) y 991 (3.9 g/caja), en presencia de tolueno las cepas 3909 (17.8 mg/caja), 2832 (17.4 mg/caja) y EH-458 (16.3 mg/caja) y con n-hexano a *Lecanicillium* 991 (15.2 mg/caja) 2149

(14.8 mg/caja) y 974 (14.8 mg/caja). Aun no existiendo diferencia significativa, en un 75% de las cepas el tolueno fue el hidrocarburo de mejor consumo (*L. lecanii* 3909), siendo en menos casos n-hexano (*L. lecanii* EH-460). A partir de los datos no sea logrando estableciéndose una relación entre el crecimiento radial y la producción de biomasa. (Figura 13).

Los estudios de degradación realizados empleando tolueno o n-hexano como fuente de carbono han sido en medio líquido o biofiltros teniendo como limitante la baja solubilidad de los hidrocarburos, observándose mayor eliminación de tolueno (Arriaga *et al*, 2005, García *et al*, 2001), en cuanto no ha sido evaluada la degradación de estos hidrocarburos en medio superficial para el hongo *Lecanicillium*.

Comparando el diámetro de las hifas se observó que existe poca diferencia entre las hifas del medio control y las del medio en presencia de tolueno, mostrando una menor inhibición en el desarrollo de la hifa por parte del tolueno que de n-hexano. En presencia de n-hexano se observó un 80% de cepas con diámetro de hifas promedio por debajo del medio con mezcla y un 90 % inferior a los diámetros en presencia de tolueno. Ratificando que es mayor el daño que sufren las hifas en presencia de n-hexano que con tolueno (Figura 14).

Presentando una diferencia significativa entre los tratamientos con hidrocarburos (Tabla AIII.10). Los mayores diámetros con n-hexano fueron las cepas de *Lecanicillium* EH-460 (1.15 μm), 2858 (0.94 μm) y 2460 (0.79 μm); adicionando tolueno se tuvieron a ATCC26854 (1.09 μm), 2149 (1.09 μm) y 157 (1.08 μm) y con la mezcla de tolueno y n-hexano a 2009 (1.02 μm), 2149 (0.94 μm) y 3909 (0.93 μm), Figura 14.

Existiendo solo en los medios con tolueno o n-hexano como hidrocarburos puros una relación entre el diámetro de las hifas y crecimiento radial, a menor crecimiento radial (micelio aglomerado), menor diámetro de hifas y mayor deformación de la hifa (Figura 12, 14 y 15).

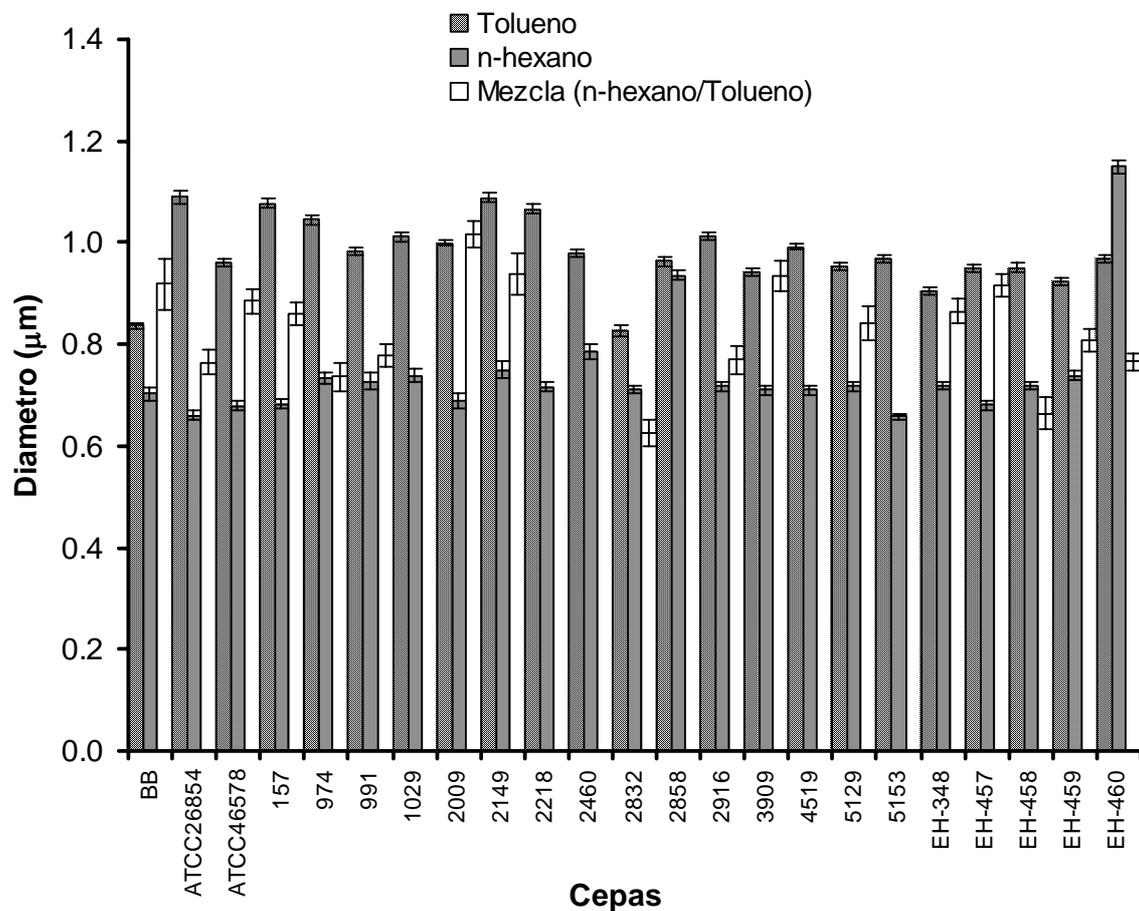


Figura 14. Diámetro de hifas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* crecidas en medio mineral empleando n-hexano y/o tolueno como fuente de carbono, medidas en micrográficas a 100x. Datos promedio de entre 70 y 90 observaciones y error estándar de la media.

En la Figura 15 b, c y d se observan hifas irregulares, deformes y delgadas en comparación al control (Figura 15a), indicando que existe un efecto de los hidrocarburos sobre la estructura, modificando la composición o estructura de la pared celular (Crespo *et al*, 2002), o cambios en la actividad metabólica impidiendo el adecuado desarrollo del hongo. Mientras que como se discutió, los medios con tolueno tiene menos irregularidades en su morfología en comparación a n-hexano (Figura 15d).

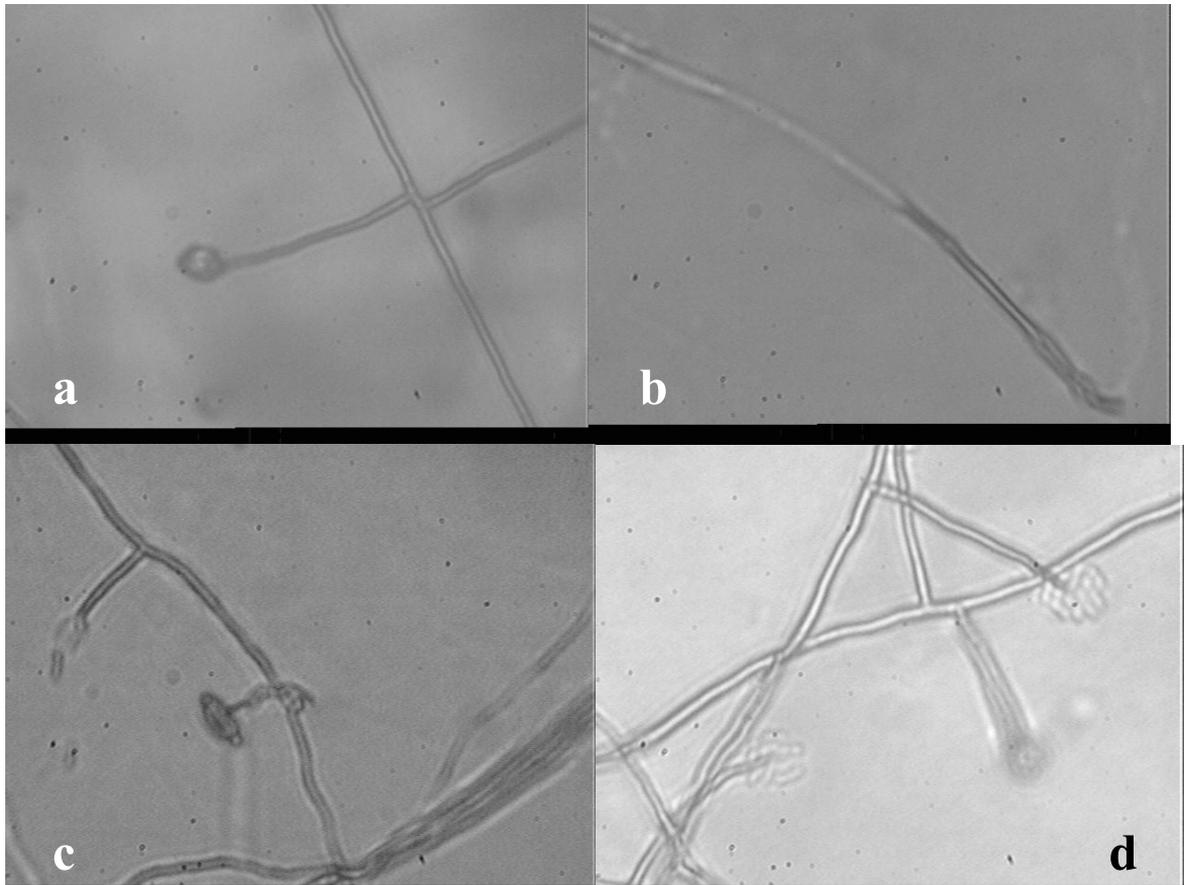


Figura 15. Micrográficas a 100x de *Lecanicillium lecanii* 2149 en cultivo superficial, medio mineral con: a) glucosa; b) mezcla de n-hexano/tolueno; c) n-hexano; d) tolueno, a 25°C.

La presencia de la mezcla de hidrocarburos (n-hexano/tolueno) provocó mayor daño en las hifas en medio superficial que en medio sumergido. Debido a la baja solubilidad de tolueno (535 mg/l) y n-hexano (9.5mg/l) en medio líquido las hifas tienen mayor exposición con tolueno. En medio superficial a causa a la volatilidad de los hidrocarburos el ambiente es saturado principalmente por n-hexano, asociado a que en este medio las hifas presentan mayor área de contacto se observo mayor daño en las hifas, presentando un desarrollo semejante al observado en los medios con n-hexano puro.

Selección de cepas con actividad quinolítica y degradadoras de hidrocarburos en medio superficial enriquecido con quitina coloidal.

Con la finalidad de determinar la producción de quitinasas extracelulares como respuesta a la hidrofobicidad se adicionó quitina coloidal a los medios con hidrocarburos. La cual se aprecia por la aparición de halos de hidrólisis.

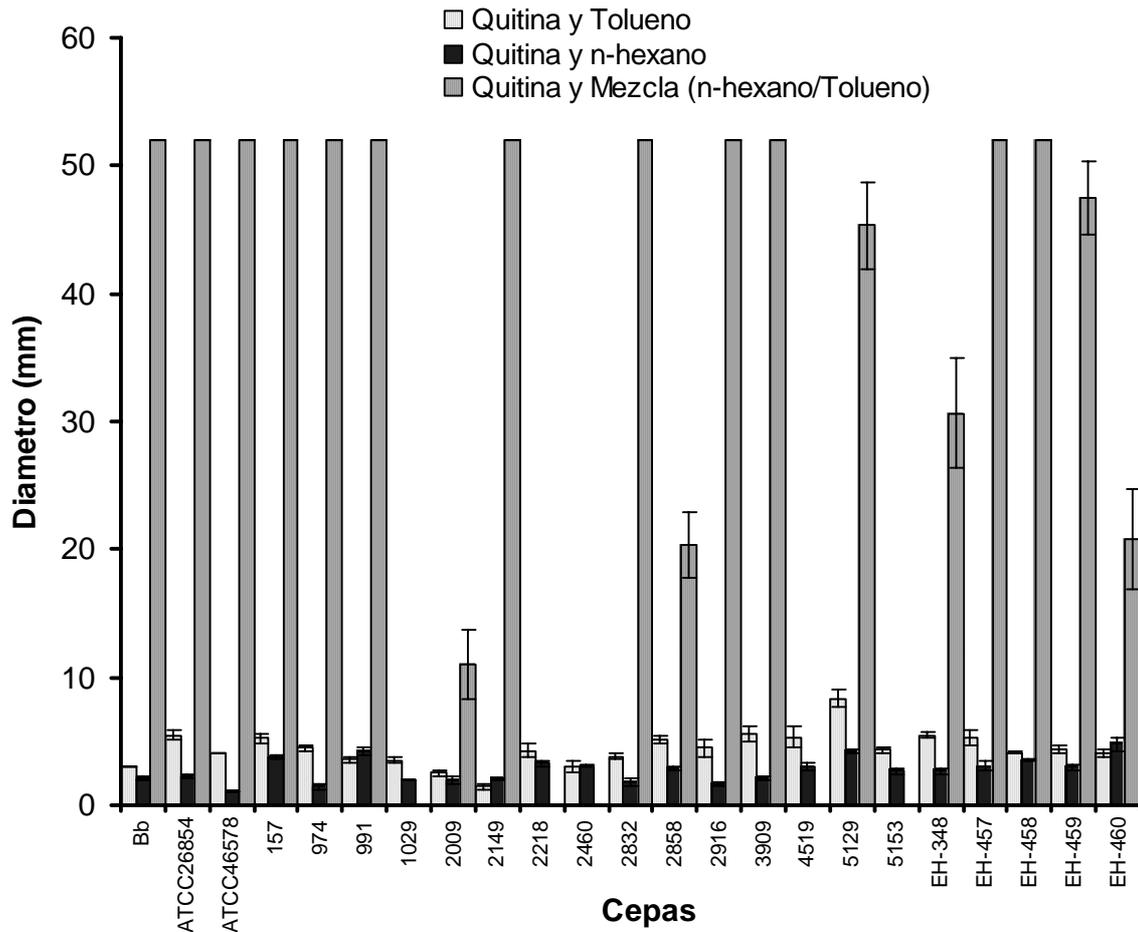


Figura 16. Crecimiento radial de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en medio mineral, quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno). Datos promedio de 6 observaciones y error estándar de la media.

Las cepas en medio mineral con quitina coloidal (control) tuvieron un crecimiento radial que cubrió el área total del medio de cultivo en más del 95% de los casos después de los 30 días de incubación, observándose un micelio abundante y denso. Adicionando la mezcla de

hidrocarburos (n-hexano y tolueno) al medio con quitina coloidal se tuvo un micelio escaso, ramificado y disperso que se extendió sobre la superficie del medio de cultivo, cubriendo esta en un 70% de los casos; con un micelio más fino que el del medio control (comportamiento similar a los medios con solo la mezcla de hidrocarburos), presentando halos de hidrólisis de quitina coloidal al término de la incubación únicamente en la cepa 2009.

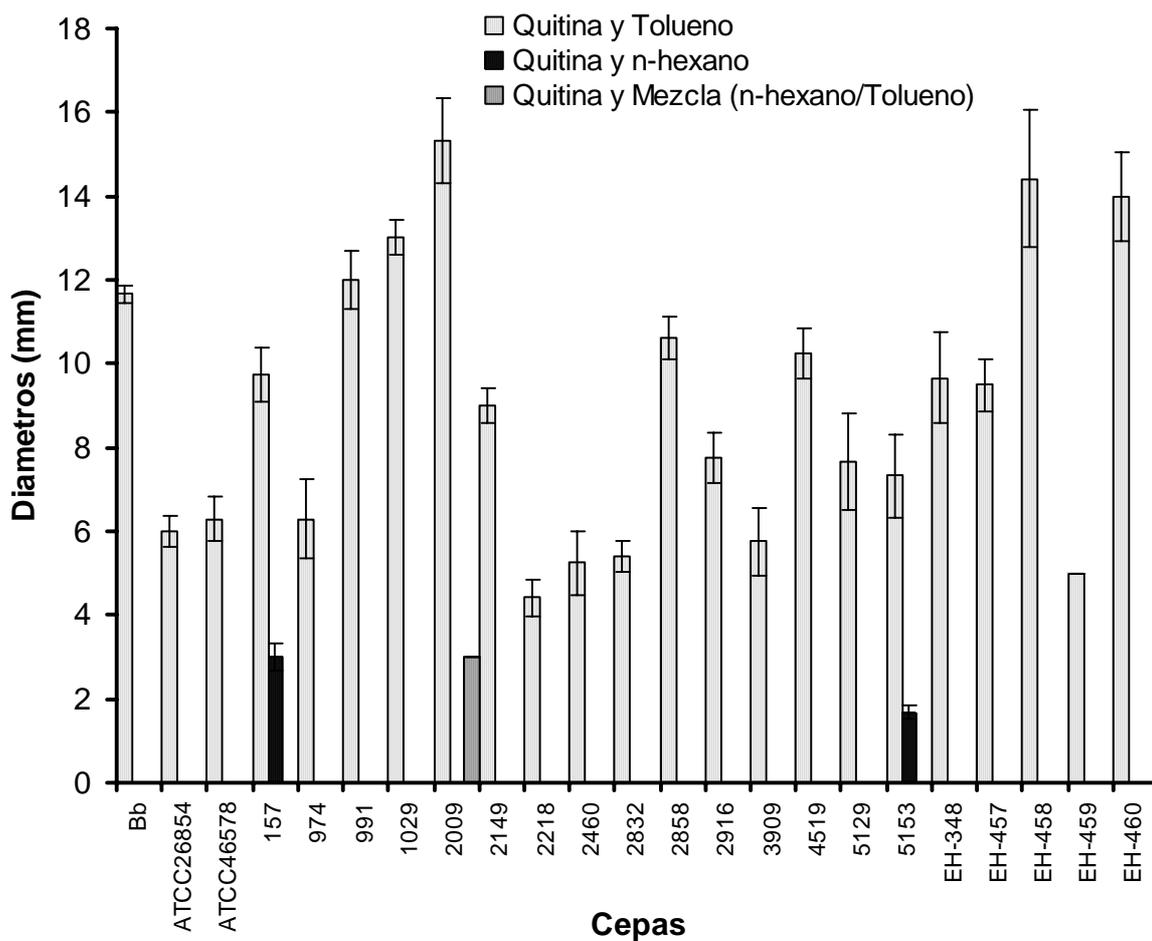


Figura 17. Halos de hidrólisis de quitina coloidal de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana*. Datos promedio de 6 observaciones y error estándar de la media.

Cuando se empleó n-hexano o tolueno como fuente de carbono en medio mineral con quitina coloidal se halló un crecimiento radial menor al medio control, sobre todo con n-hexano. Presentando el mayor crecimiento radial las cepas EH-460 (4.75 mm), 991(4.17 mm) y 5129 (4.17 mm), teniendo halos de hidrólisis de quitina coloidal solo las cepas 157

(3.00mm) y 5153 (1.67 mm). En cuanto a los medios con tolueno el crecimiento radial fue significativamente mayor comparado con n-hexano (Tabla AIII.12), siendo las mejores cepas *Lecanicillium* 5129 (8.33 mm), 3909 (5.58 mm) y EH-348 (5.50 mm), mostrando todas las cepas halos de hidrólisis de quitina coloidal. Utilizando ambos hidrocarburos las características en su crecimiento fueron similares, un micelio aglomerado y filamentoso con hifas delgadas (Figuras 16 y 17).

Las cepas mostraron un cambio en su desarrollo (efecto inhibitorio) por la adición de hidrocarburos al medio de cultivo (medio mineral con quitina coloidal), presentando un crecimiento radial 6 veces menor al del medio control, con la presencia de un micelio más fino al observado, indicando que la asimilación de quitina coloidal se ve modificada por la presencia del hidrocarburo, y principalmente por n-hexano, siendo más lento el consumo de la quitina del medio, no presentando halos de hidrólisis de quitina coloidal. Tortella *et al*, (2005) describieron que en el metabolismo de contaminantes (tolueno) son involucradas algunas enzimas extracelulares tanto como otros factores relacionados con los procesos. Factores que pueden estar modificando a su vez la expresión de las quitinasas o la actividad entomopatogena.

En la determinación de biomasa por peso seco se observó poca variación entre las condiciones, no hallándose diferencia significativa entre los tratamientos con hidrocarburo al medio con quitina (Tabla AIII.14). La producción biomasa más alta se obtuvo en el medio con quitina coloidal como única fuente de carbono (2009, 3909 y 2916). Teniendo como las cepas con mejor producción de biomasa con mezcla de n-hexano y tolueno a *Lecanicillium* 2149 (62.2 mg/caja), ATCC46578 (13.5 mg/caja) y 3909 (12.2 mg /caja). Siendo la cepa 2149 la que presentó el mejor crecimiento con quitina y mezcla de hidrocarburos tanto en medio líquido con y sin extracto de levadura (Figura 7) como en cultivo superficial (Figura 18 y Tabla AIII.15). Las cepas con mayor producción de biomasa empleando medio mineral con quitina y tolueno fueron las cepas 5153 (29.8 mg/caja), 2916 (28.2 mg/caja) y 974 (19.9 mg/caja); y en medio mineral con quitina y n-hexano a 974 (30.3 mg/caja), 157 (26.1 mg/caja) y *B. bassiana* (25.5 g/caja), Figura 18.

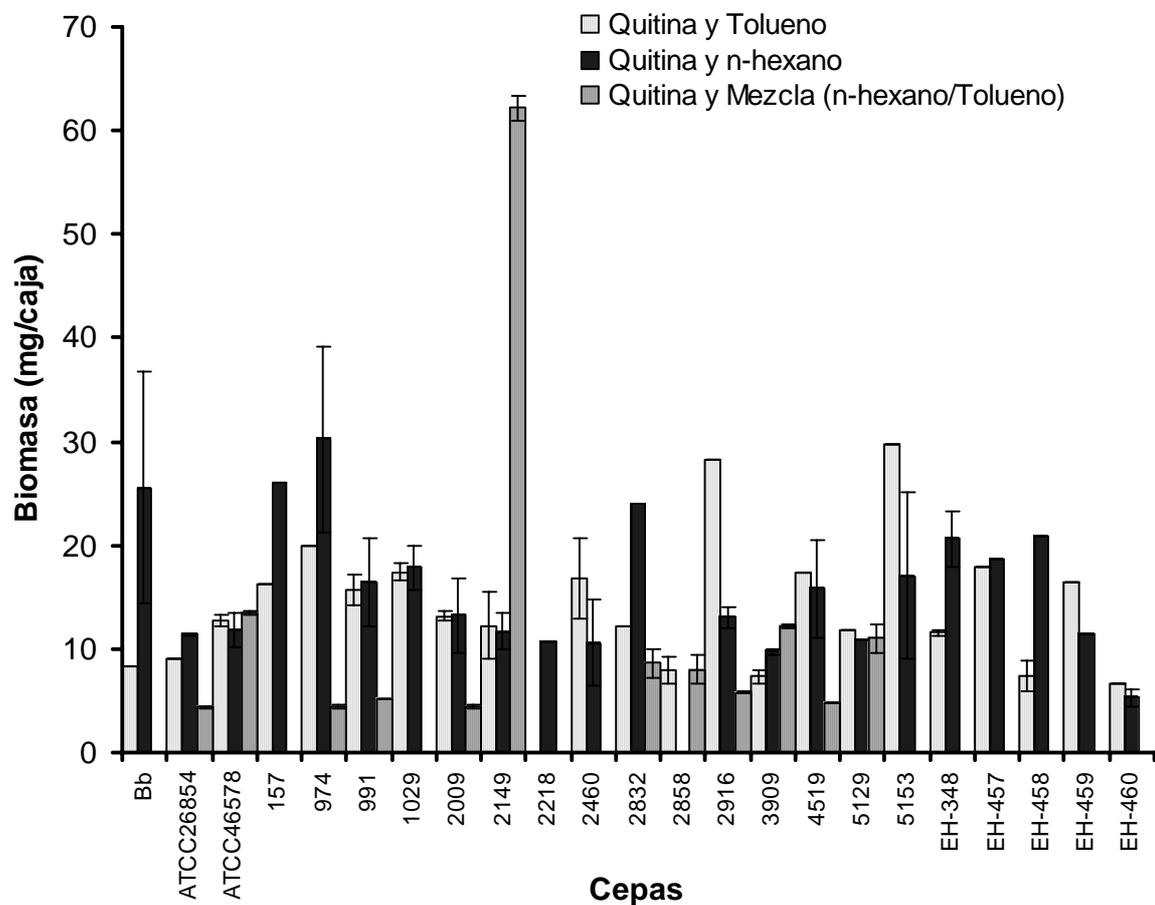


Figura 18. Biomasa de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en medio mineral con quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno) como fuente de carbono, a 25°C. Datos promedio de 2 observaciones y error estándar de la media.

Analizando el diámetro de las hifas de los medios de cultivo empleando quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno), se notó la menor diferencia entre las hifas del medio control y las del medio con tolueno, que fueron ligeramente irregulares. En tanto el diámetro de las hifas del medio con n-hexano o la mezcla (n-hexano y tolueno) fue menor al del medio control o con tolueno, no mostrando diferencia entre los diámetros (n-hexano y mezcla), con excepción de las cepas 2460 y EH-460 que tuvieron el mayor diámetro en el medio con n-hexano (Figura 19 y Figura 20). Tiendo diferencia significativa en los tratamientos en función del hidrocarburo (Tabla AIII.16). En el caso de la cepa EH-460 además de mostrar el mejor

crecimiento radial tuvo uno de los mayores diámetros de las hifas (menor daño por parte de n-hexano), como se observa en la Figura 16 (Tabla AIII.17).

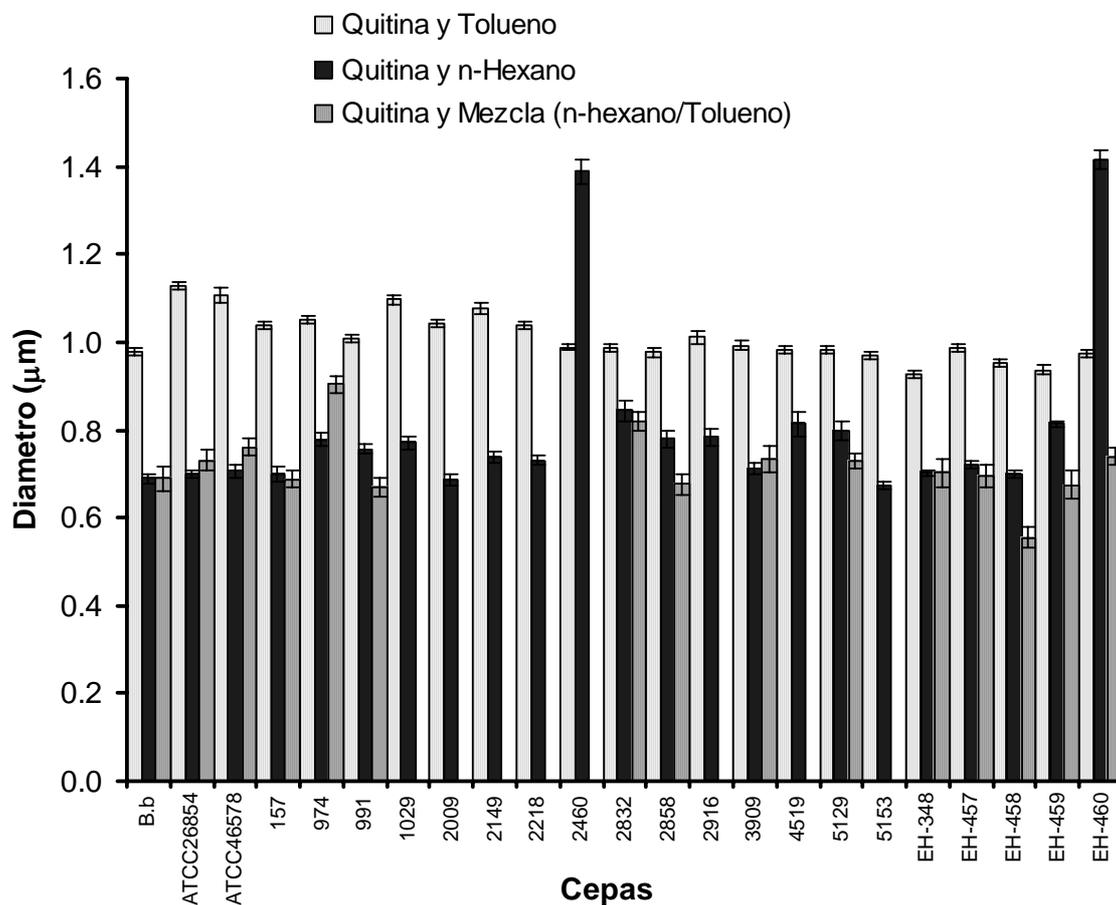


Figura 19. Diámetro de hifas de *Lecanicillium* crecidas en medio mineral con quitina coloidal empleando n-hexano y/o tolueno como fuente de carbono, medidos en micrográficas a 100x. Datos promedio de entre 70 y 90 observaciones y error estándar de la media.

Los mayores diámetros de hifas fueron mostrados por las cepas de *Lecanicillium* ATCC26854 (1.127 µm), ATCC46578 (1.12 µm) y 1029 (1.10 µm) empleando tolueno; con n-hexano a EH-460 (1.42 µm), 2460 (1.39 µm) y 2832 (0.84 µm); y en presencia de la mezcla de n-hexano y tolueno a 974 (0.90 µm), 2832 (0.82 µm) y ATCC46578 (0.76 µm), Figura 19.

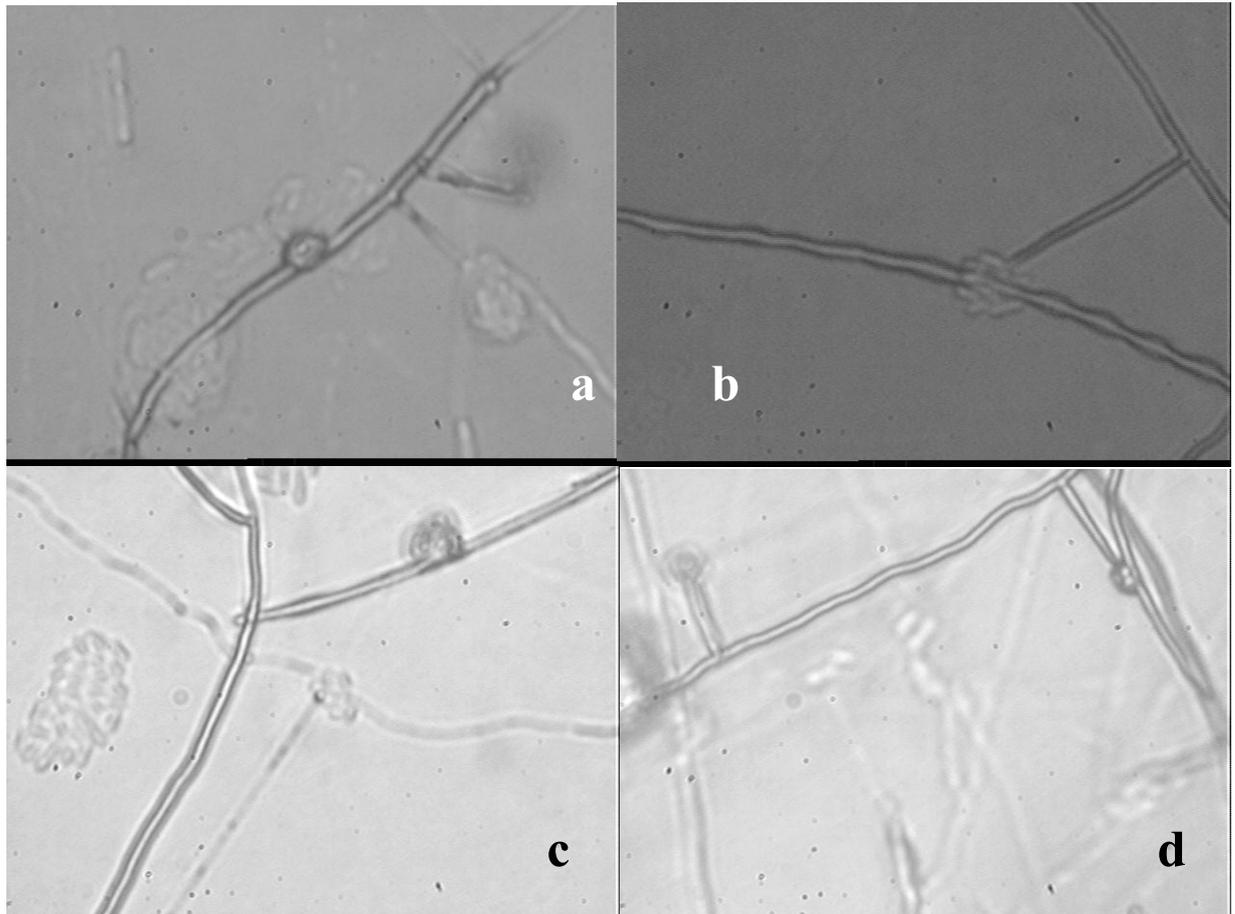


Figura 20. Micrográficas a 100x de *L. lecanii* 2149 en cultivo superficial de medio mineral con: a) Quitina; b) Quitina y mezcla de n-hexano/tolueno; c) quitina y n-hexano; d) quitina y tolueno, a 25°C.

Con estos resultados se tiene que el hidrocarburo que causa mayor daño al hongo (disminución del diámetro de las hifas y deformación con respecto al control) en medio superficial con quitina coloidal es n-hexano, al parecer inhibe las actividades quitinolíticas o daña al hongo evitando la asimilación adecuada de la quitina coloidal, presentando hifas más delgadas y deformes. Por otra parte el efecto del tolueno no es tan marcado en la estructura de la hifa ni en la asimilación de la quitina, mostrando un diámetro de las hifas similar al del medio control y un crecimiento radial mayor que con n-hexano. La utilización de la mezcla de hidrocarburos (n-hexano y tolueno) en el medio produjo un alteración en las hifas análoga al del medio con n-hexano, poseyendo un diámetro de las hifas similar, por lo que la presencia de

las dos fuentes de carbono es el factor que provoca el crecimiento de las hifas en una forma dispersa sobre el superficie del medio (Figura 20).

Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos (n-hexano y/o) en medio superficial enriquecido con glucosa y quitina coloidal.

Empleando glucosa y quitina coloidal como fuente de carbono de más fácil asimilación se examino el desarrollo del hongo en presencia de tolueno y/o n-hexano.

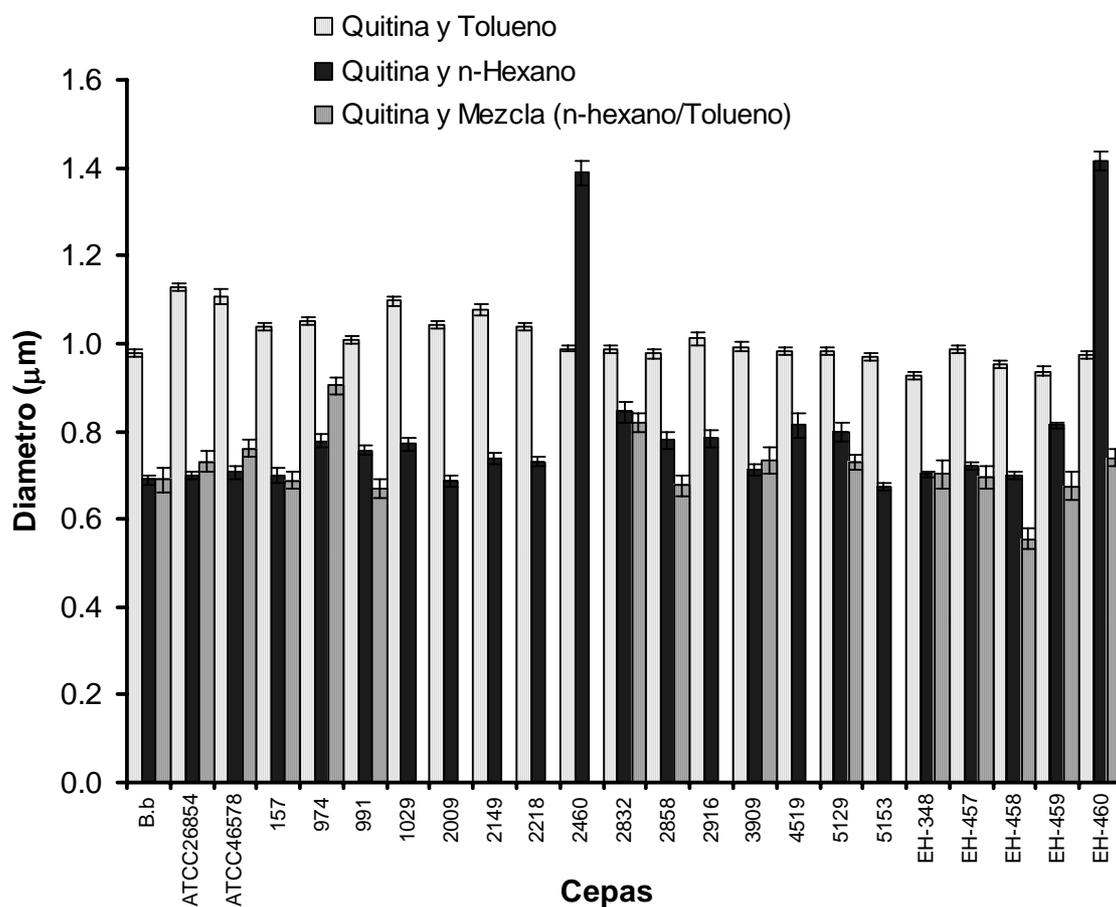


Figura 21. Crecimiento radial de cepas de *Lecanicillium* y *B. bassiana* en medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno). Datos promedio 6 observaciones y error estándar de la media.

Después de incubar los medios por 30 días, todos los medios control (con glucosa y quitina) cubrieron la superficie del medio de cultivo, con un micelio aglomerado, abundante y espesó (EH-460). El medio mineral con la adición de la mezcla de hidrocarburos (n-hexano y tolueno), presentó el mismo comportamiento que en casos anteriores (medio mineral con quitina coloidal y medio mineral), un crecimiento disperso, ramificado, poco abundante, que cubrió más del 85% de la superficie del medio. En los medios con tolueno o n-hexano el crecimiento fue concentrado, abundante y espesó, semejante al desarrollo del micelio en el medio control, pero con hifas más finas. Siendo significativamente mayor el crecimiento radial en presencia de n-hexano (Tabla AIII.18). Las cepas con mejor crecimiento radial en mezcla fueron *Lecanicillium* 157 (52 mm), 2149 (46.33 mm) y EH-460 (52 mm). Empleando n-hexano como las mejores cepas de *Lecanicillium* se tuvieron a 2149 (50 mm), EH-458 (39 mm) y 2460 (36.83 mm), mientras en presencia de tolueno a *Lecanicillium* EH-458 (24.33 mm), 991 (16.25 mm) y 5153 (14.33 mm), Figura 21. No observándose bajo ninguna condición halos de hidrólisis de quitina coloidal al término de la incubación. A partir de estos datos se puede decir que existe mayor efecto inhibitorio de las actividades metabólicas (asimilación de glucosa y quitina coloidal del medio de cultivo) del hongo por parte del tolueno que de n-hexano.

Al adicionar n-hexano y/o tolueno al medio superficial con glucosa y quitina coloidal (fuentes de carbono de mas fácil asimilación) se observa un cambio en la estructura de las hifas (Tabla 1) siendo más finas (mostrando irregularidades) y un efecto inhibitorio en las actividades metabólicas del hongo modificando la asimilación glucosa y quitina mostrando un crecimiento radial menor al control (medio mineral con glucosa y quitina coloidal). En estos tratamientos (medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos) se tiene un comportamiento inverso a los medios con quitina coloidal e hidrocarburos en donde la presencia de n-hexano provoca un efecto inhibitorio en la asimilación de la quitina, presentando hifas mas delgadas (que en el medio con tolueno y el medio control). En los medios con glucosa y quitina el menor crecimiento radial se tuvo con la adición de tolueno, por lo que se puede suponer que el tolueno tiene un efecto inhibitorio en la asimilación de la glucosa del medio (Figura 21).

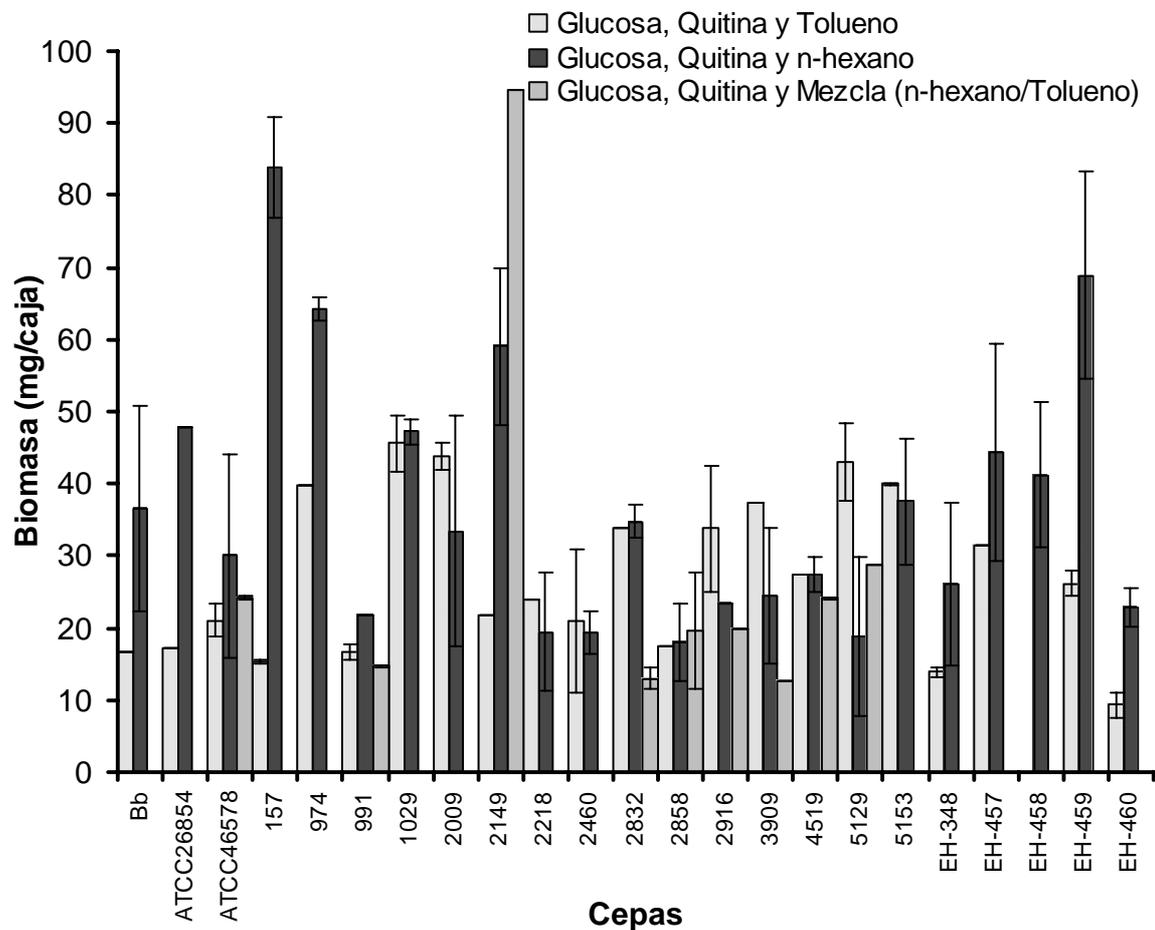


Figura 22. Biomasa de *Lecanicillium* y *B. bassiana* de medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y/o tolueno) como fuente de carbono, a 25°C. Datos promedio 2 observaciones y error estándar de la media.

La producción de biomasa fue mayor en el medio control correspondiendo a la utilización de dos fuentes de carbono empleadas (glucosa y quitina coloidal), coincidiendo con el comportamiento en el crecimiento radial. En los medios con hidrocarburos solo fue significativamente diferente el tratamiento con la mezcla de n-hexano y tolueno (Tabla AIII.20). Determinando mayor biomasa en el medio con n-hexano las cepas 157 (83.9 mg/caja, que presentó halo de hidrólisis de quitina en presencia de n-hexano), EH-459 (68.9 mg/caja) y 974 (64.3 mg/caja). Con tolueno en las cepas 1029 (45.7 mg/caja), 2009 (43.8 mg/caja) y 5129 (42.9 mg/caja) y utilizando la mezcla de hidrocarburos a ATCC46578 (24.2

mg/caja), 5129 (28.7 mg/caja) y 2149 (94.5 mg/caja, cepa que ha mostrado mejor crecimiento en medio líquido y mezcla de hidrocarburos o medio superficial con quitina y mezcla), Figura 22.

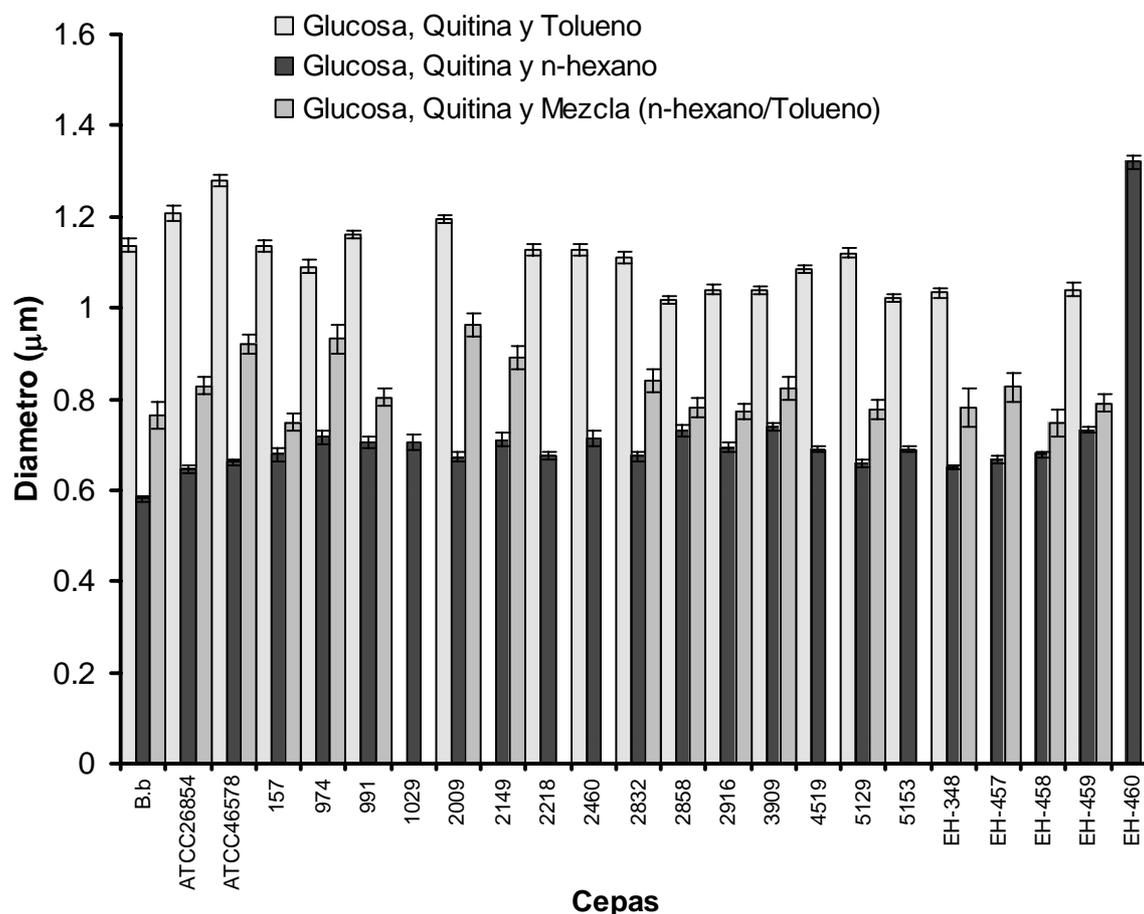


Figura 23. Diámetro de las hifas de *Lecanicillium* en medio mineral con glucosa y quitina coloidal con n-hexano y/o tolueno, de micrográficas a 100x. Datos promedio de entre 80 y 100 observaciones y error estándar de la media.

Comparando los diámetros de las hifas de cepas crecidas en medio mineral con glucosa y quitina coloidal adicionando hidrocarburos, al emplear tolueno se tienen los diámetros mayores, semejantes a los determinados en medio control y las hifas en presencia de n-hexano los diámetros menores. En cuanto a las hifas en medios con la mezcla de hidrocarburos los diámetros fueron 20% mayores que en presencia de n-hexano, siendo significativamente

diferente el tratamiento en que se adicionó solo tolueno al medio (Tabla AIII.22). Indicando que es mayor la deformidad en las hifas por la acción del n-hexano, efecto que se observó con o sin otra fuente de carbono (quitina coloidal, glucosa). Teniendo a las cepas con mayor diámetros de hifas: en el medio con tolueno a ATCC46578 (1.28 μm), ATCC26854 (1.21 μm) y 2009 (1.19 μm), en presencia n-hexano a EH-460 (1.32 μm), 3909 (0.74 μm) y EH-459 (0.73 μm); y utilizando la mezcla de hidrocarburos a 2009 (0.96 μm), 974 (0.93 μm) y ATCC46578 (0.92 μm), Figura 23.

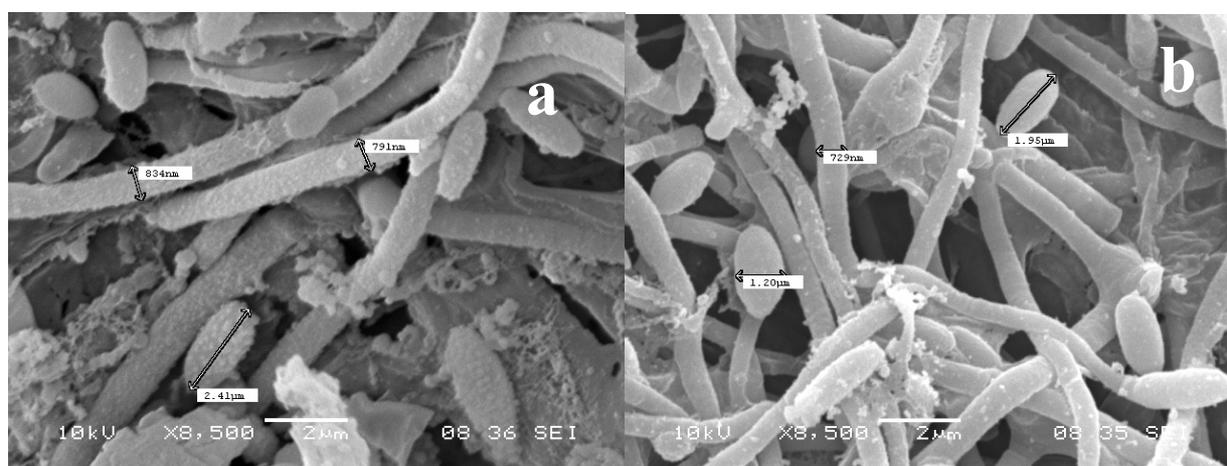


Figura 24. Crecimiento apical de *L. lecanii* 991 en medio mineral con: a) Glucosa, Quitina coloidal y n-hexano; b) n-hexano (x 8,500).

En los medios con glucosa y quitina coloidal el consumo de estas fuentes de carbono se ve reprimido por la adición de hidrocarburos, provocando una disminuyendo del diámetro de las hifas, observando menor diámetro en presencia de n-hexano como única fuente de carbono (Figura 23). En la Figura 24 se observa el desarrollo de *L. lecanii* 991 en medio mineral con glucosa, quitina y n-hexano (0.83 μm) en donde es evidente la formación de micelio más fino empleando solo n-hexano (0.61 μm), Tabla AIII.24. No habiendo diferencia significativa en el diámetro de las esporas (Tabla AIII.25, Figura 24). Jackson *et al*, (1985) reportó que el tamaño de la spora no está relacionado con la virulencia (capacidad entomopatógena).

De los estudios morfológicos realizados en hongos crecidos en presencia de hidrocarburos se ha estudiado el tamaño de conidios en *Scopulariopsis brevicaulis* (Alba *et al*, 2003); el

diámetro de las hifas de *A. niger* en un biofiltro alimentado con n-hexano donde presento un diámetro de hifas de 5 µm observando variaciones entre 1 a 10 µm; *Fusarium solani* (hongo degradador de hexano) al crecer en un biofiltro con hexano tuvo un diámetro de hifas de 2.99 µm diámetro (Vergara *et al*, 2006). Observando un diámetro de hifas mayor en cepas capaces de degradar n-hexano en comparación al determinado en las hifas de *Lecanicillium*, que puede indicar mayor sensibilidad por parte del hongo o cambios en función del genero.

De acuerdo a los resultados n-hexano fue el hidrocarburo que provocó mayor daño (disminución del diámetro y deformidad) sobre la estructura de las hifas en medio superficial con o sin otra fuente de carbono (quitina coloidal y/o glucosa) causando inhibición en el desarrollo del hongo, presentando el menor crecimiento radial, diámetro de hifas y producción de biomasa. Indicando que existe una cambio en la composición en la pared celular, que de acuerdo a Crespo *et al*, (2002) es causada por un cambio en la proporción de los lípidos, a la perdida de habilidad para germinar (Funtikova *et al*, 2003) y el daño (desnaturalización) que el hidrocarburo provoca sobre la estructura de la hifa.

VII.3. Determinación de actividad degradadora de hidrocarburos (hexano o tolueno) y quitinolítica en microcosmos de cepas de *Lecanicillium lecanii*.

VII.3.1. Evaluación de actividad degradadora y quitinolítica de *Lecanicillium* EH-460, 157 y 2149, en medio sumergido.

A partir de los resultados de la selección de cepas degradadoras de hidrocarburos tanto de cultivos sumergido y medio superficial se decidió emplear tres cepas de *L. lecanii*: EH-460, 157 y 2149, para realizar los experimentos en medio mineral líquido (microcosmos) de degradación de tolueno o n-hexano, solos y adicionados con quitina coloidal. Se determinaron parámetros cinéticos, tales como velocidad de consumo, consumo máximo de hidrocarburos (n-hexano o tolueno) y actividades quitinolíticas.

Se escogieron las cepas de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149 a partir de la selección realizada en medio líquido y superficial considerando lo siguiente:

- *L. lecanii* EH-460 tuvo mayor diámetro de hifa en medio mineral con mezcla de hidrocarburos (n-hexano y tolueno) en medio sumergido (Figura 11) y medio superficial en presencia de n-hexano con o sin quitina coloidal, un crecimiento radial y los diámetros de hifas fueron mayores (Figuras 12, 14, 16 y 19), presentando mayor halo de hidrólisis de quitina coloidal en presencia de tolueno (Figura 17).
- La cepa 157 mostró crecimiento radial y mayores diámetros de las hifas en presencia de tolueno como única fuente de carbono en medio superficial (Figura 12 y 14), en presencia de quitina al término de la incubación (30 días) presento halos de hidrólisis de quitina en presencia de tolueno o n-hexano (Figura 17).
- La cepa 2149 en cultivo sumergido con mezcla de hidrocarburos con o sin extracto de levadura tuvo una producción de biomasa alta (Figura 7), de igual forma en medio superficial empleando la mezcla de hidrocarburos y n-hexano como únicas fuentes de carbono (Figura 13), teniendo el menor daño en el diámetro de sus hifas en presencia de la mezcla de hidrocarburos y tolueno (Figura 14), en medio superficial con quitina coloidal presentó halo de hidrólisis de quitina en presencia de tolueno (Figura 17), además de uno de los crecimientos radiales mayores en medio mineral con quitina coloidal y la mezcla de n-hexano y tolueno (Figura 16) con una alta producción de biomasa (Figura 18).

Las cepas seleccionadas (EH-460, 157 y 2149) se inocularon (VI.1.2) en las botellas serológicas con medio líquido de acuerdo a la metodología (VI.3.2) variando la fuente de carbono de medio mineral líquido con: quitina coloidal y/o n-hexano, tolueno. A los que se realizaron mediciones periódicas del hidrocarburo y CO₂ durante la incubación (80 días), al término se determinó la actividad quitinolítica en los extractos enzimáticos, biomasa (proteína total), pH y azúcares reductores.

En medio mineral con n-hexano como única fuente de carbono (MH), la cepa 157 tuvo la mayor eliminación, con un consumo de 14.9 g de n-hexano/m³ (0.013 g de n-hexano/g proteína•h), transcurrido 1920 h. En cuanto a las primeras 66 h la cepa EH-460 presentó un consumo significativamente más alto que en las otras cepas. Para *Lecanicillium* 157 se

observó mayor consumo del hidrocarburo entre las 140 h y 240 h comparados con las otras cepas, mostrando la mejor velocidad de consumo de n-hexano (7.90×10^{-3} g de n-hexano/ $m^3 \cdot h$). En general la mayor eliminación de n-hexano en el sistema se tiene a las primeras 400 h, tiempo a partir del que el consumo se hace constante (Figura 25, Tabla 3), permitiendo adaptarse a un modelo lineal. Con respecto a la producción de CO_2 en el medio MH las cepas presentaron un comportamiento semejante, una baja producción de CO_2 , no detectable por el equipo o en bajas concentraciones, no encontrándose tendencia en las mediciones. Realizando un consumo alrededor del 0.5 % del O_2 (3.65×10^{-3} mmol).

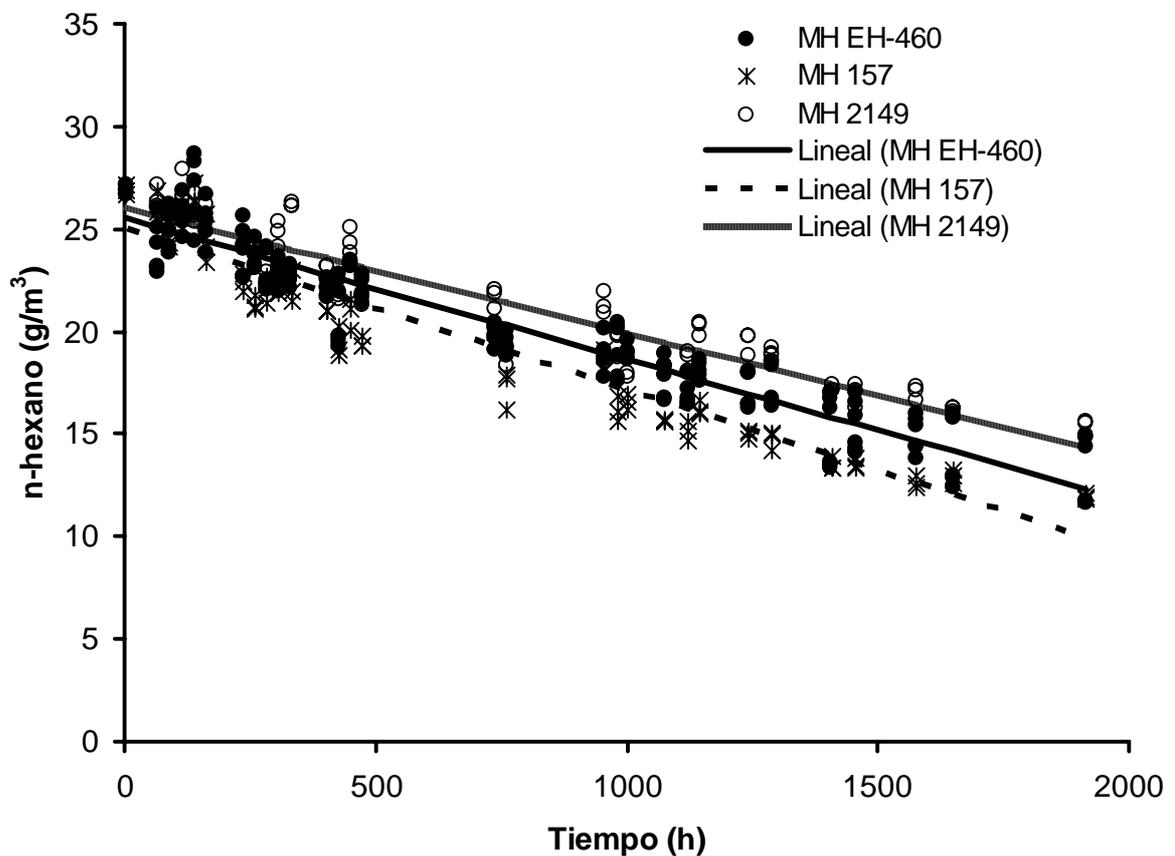


Figura 25. Consumo de n-hexano en microcosmos con medio líquido de las cepas de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149.

Adicionando quitina coloidal en el medio de cultivo con n-hexano (MQH), las cepas 157 y 2149 tuvieron el mejor consumo (14.5 g de n-hexano/m³) y velocidad máxima (9X10⁻³ g de n-hexano/m³•h). *L. lecanii* EH-460 realizó un consumo mayor durante las primeras 66 h y entre las 130 h y 260 h, mientras que la cepa 157 lo ejecutó durante las 130 h a 260 h, y *Lecanicillium* 2149 entre las 320 h a 420 h (Figura 26 y Tabla 3), adaptándose al modelo lineal a partir de las 400 h.

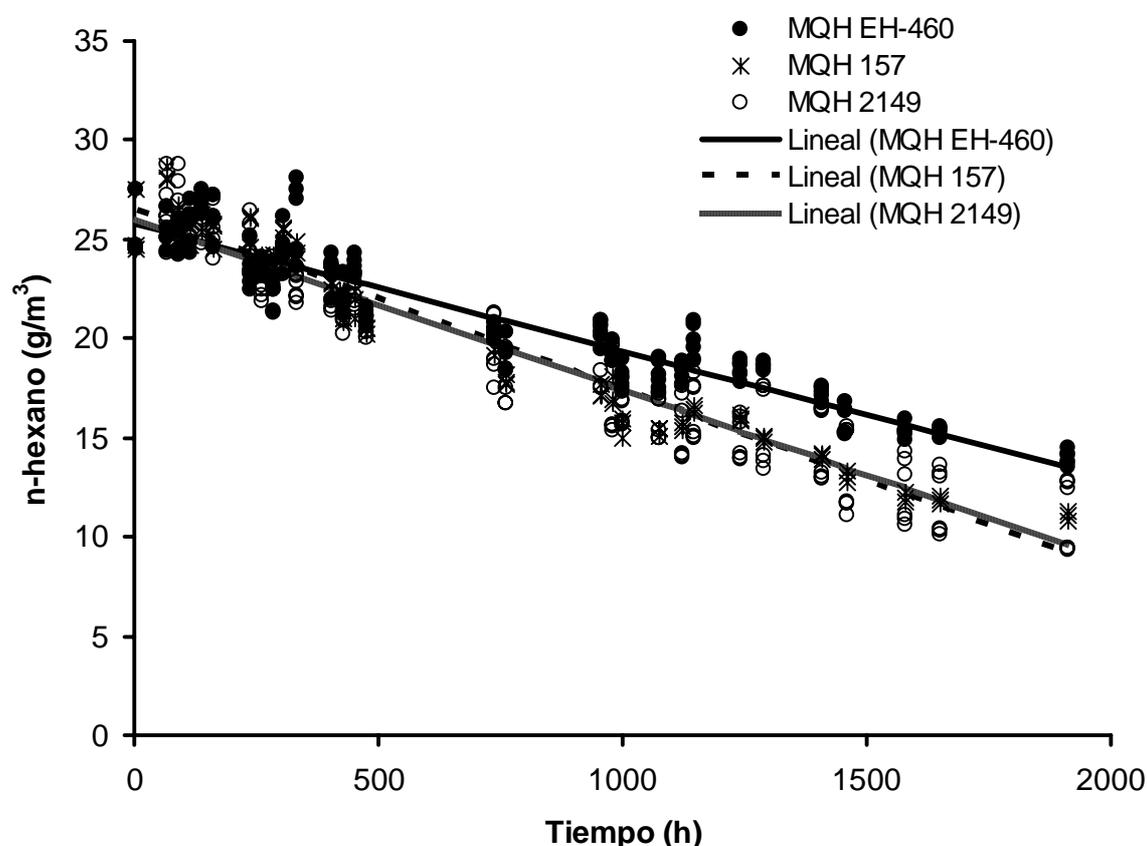


Figura 26. Consumo de n-hexano en microcosmos con medio líquido y quitina coloidal de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149.

Comparando el medio mineral MH y MQH se observó variación en los consumos dependiendo de la cepa, en *L. lecanii* 157 la adición de quitina coloidal disminuyó un 3% el consumo (de 14.9 a 14.5 g de n-hexano/m³ respectivamente) aumentando la velocidad máxima

de consumo de n-hexano (7.90×10^{-3} a 9.10×10^{-3} g de n-hexano/ $m^3 \cdot h$). En tanto *L. lecanii* EH-460 presentó una disminución de 15 % por la adición de quitina coloidal al medio de cultivo y una disminución de la velocidad máxima de consumo (6.90×10^{-3} a 6.40×10^{-3} g de n-hexano/ $m^3 \cdot h$), mientras *L. lecanii* 2149 incrementa el consumo de n-hexano un 25% al adicionar quitina coloidal en el medio, acrecentando la velocidad máxima de consumo (6.10×10^{-3} a 8.60×10^{-3} n-hexano/ $m^3 \cdot h$), Figura 25, 26 y Tabla 3.

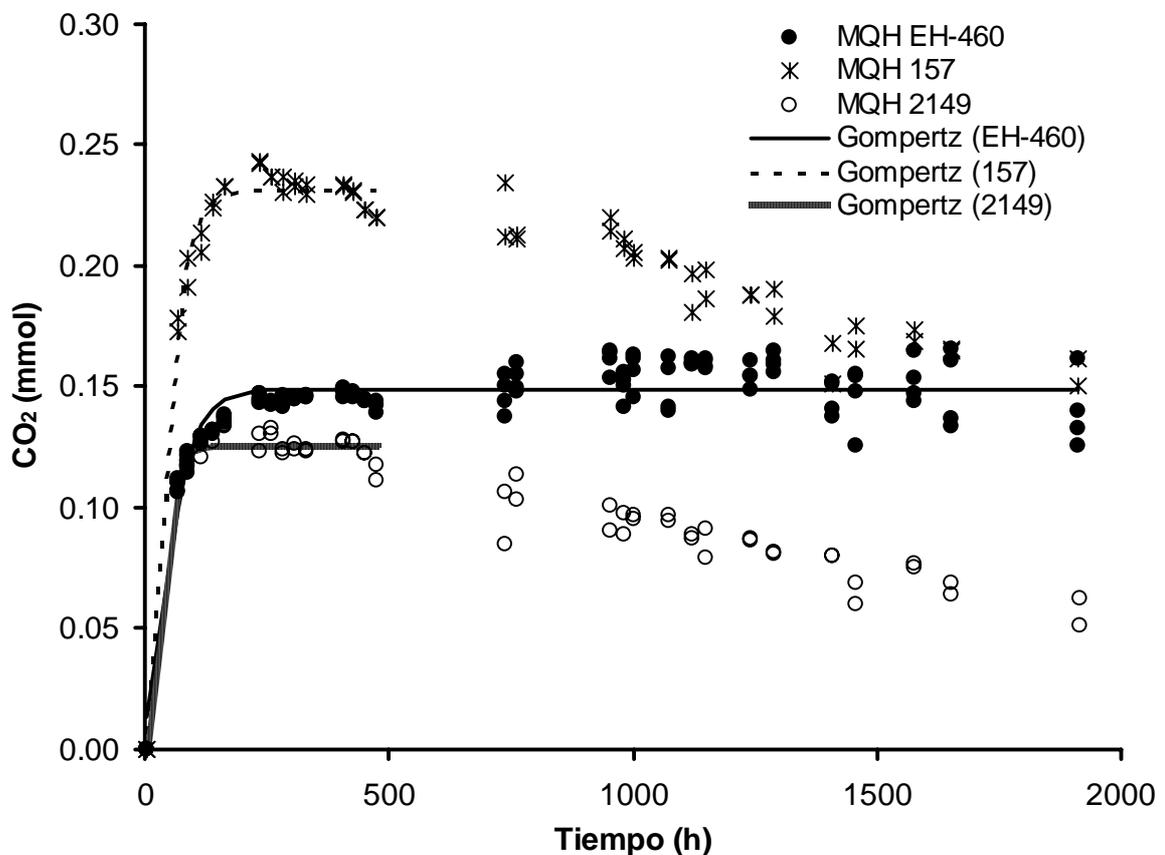


Figura 27. Producción de CO₂ en medio mineral con quitina coloidal y n-hexano de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149.

La determinación de CO₂ solo se pudo realizar en los medios en que se adicionó quitina coloidal, presentándose concentraciones suficientes para detectarse por el equipo. La producción CO₂ en el medio MQH se observó en aumento desde de las primeras horas hasta

las 160 h aproximadamente, tiempo en que comenzó a ser estacionaria en las cepas, alcanzando la concentración máxima de CO₂ *Lecanicillium* 157 (0.24 mmol), Figura 27. Teniendo la velocidad máxima de producción de CO₂ (3.90X10⁻³ mmol CO₂/h) *L. lecanii* 2149 (Tabla 4).

Dentro del intervalo de 130 a 260 horas se observó un descenso en la concentración de n-hexano, coincidiendo con el tiempo donde ha comenzado a agotarse la quitina en el medio de cultivo, por tanto el hongo empieza a asimilar n-hexano (segunda fuente de carbono), Figura 26. El consumo de O₂ se inició a partir de las primeras horas siguiendo un comportamiento lineal hasta las 120 h en que se hizo estacionario, realizando un consumo máximo de 20% del O₂ (0.146 mmol), en las cepas de estudio.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de consumo de n-hexano o tolueno por *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149 en microcosmos con medio mineral, con o sin quitina coloidal a 180 rpm y 25°C.

Cepa	Condición	pH	S _{max} (g/m ³)	Biomasa (g de proteína/m ³)	V _{max} (g/m ³ ·h)	R ²	V consumo específico (g/g proteína·h)
EH-460	MH	5.65	25.5	0.29	6.90X10 ⁻³	0.9505	0.0235
157	MH	5.77	25.0	0.59	7.90 X10 ⁻³	0.9593	0.0134
2149	MH	5.62	26.1	0.83	6.10 X10 ⁻³	0.906	0.0073
EH-460	MQH	5.96	25.8	4.09	6.40 X10 ⁻³	0.9090	0.0016
157	MQH	5.89	26.5	5.40	9.10 X10 ⁻³	0.9515	0.0017
2149	MQH	5.89	26.1	4.29	8.60 X10 ⁻³	0.9069	0.0020
EH-460	MT	5.72	26.8	0.05	5.40 X10 ⁻³	0.8649	0.1056
157	MT	5.68	26.5	0.15	7.30 X10 ⁻³	0.9047	0.0501
2149	MT	5.68	26.2	0.69	5.70 X10 ⁻³	0.8390	0.0083
EH-460	MQT	5.9	26.3	5.05	7.50 X10 ⁻³	0.8753	0.0015
157	MQT	5.9	26.6	2.50	5.80 X10 ⁻³	0.8625	0.0023
2149	MQT	5.97	27.3	3.09	6.40 X10 ⁻³	0.8810	0.0021

*Valores ajustados a la ecuación lineal.

MH - Medio mineral con n-hexano, MQH - Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MT - Medio mineral con tolueno, MQT - Medio mineral con quitina coloidal y tolueno.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de producción de CO₂ de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149, estimados en microcosmos con medio mineral enriquecidos con quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano o tolueno) a 180 rpm y 25°C

Cepa	Condición	P _{max} (mmol CO ₂)	k (h ⁻¹)	V _{max} (mmol CO ₂ /h)	R ²
EH-460	MQH	0.1472	0.0292	0.0016	0.9205
157	MQH	0.2310	0.0381	0.0032	0.9863
2149	MQH	0.1255	0.0848	0.0039	0.9765
EH-460	MQT	0.1411	0.0129	0.0007	0.9722
157	MQT	0.1557	0.0183	0.0010	0.9894
2149	MQT	0.1752	0.0064	0.0004	0.9836

*Valores ajustados al modelo de Gompertz.

MQH - Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQT - Medio mineral con quitina coloidal y tolueno.

En medio MT, se halló un consumo máximo de 15.4 g de tolueno/m³ por *L. lecanii* 157, presentando la mejor velocidad máxima (7.30×10^{-3} g de tolueno/m³·h) del tratamiento (Figura 28), teniendo un consumo aproximado *L. lecanii* 2149 (14.2 g de tolueno/m³) con menor velocidad de consumo (5.70×10^{-3} g de tolueno/m³·h). En tanto la cepa EH-460 mostró el menor consumo final (11.6 g de tolueno/m³). El consumo de tolueno se realizó con más rapidez durante las primeras 140 h, particularmente dentro del intervalo de 110 h a 140 h (Figura 28), siguiendo una tendencia lineal a partir de las 300 h. Existiendo en los extractos una disminución (Tabla 3) en el pH que puede estar relacionado con la formación de productos de la degradación de tolueno (ácidos grasos).

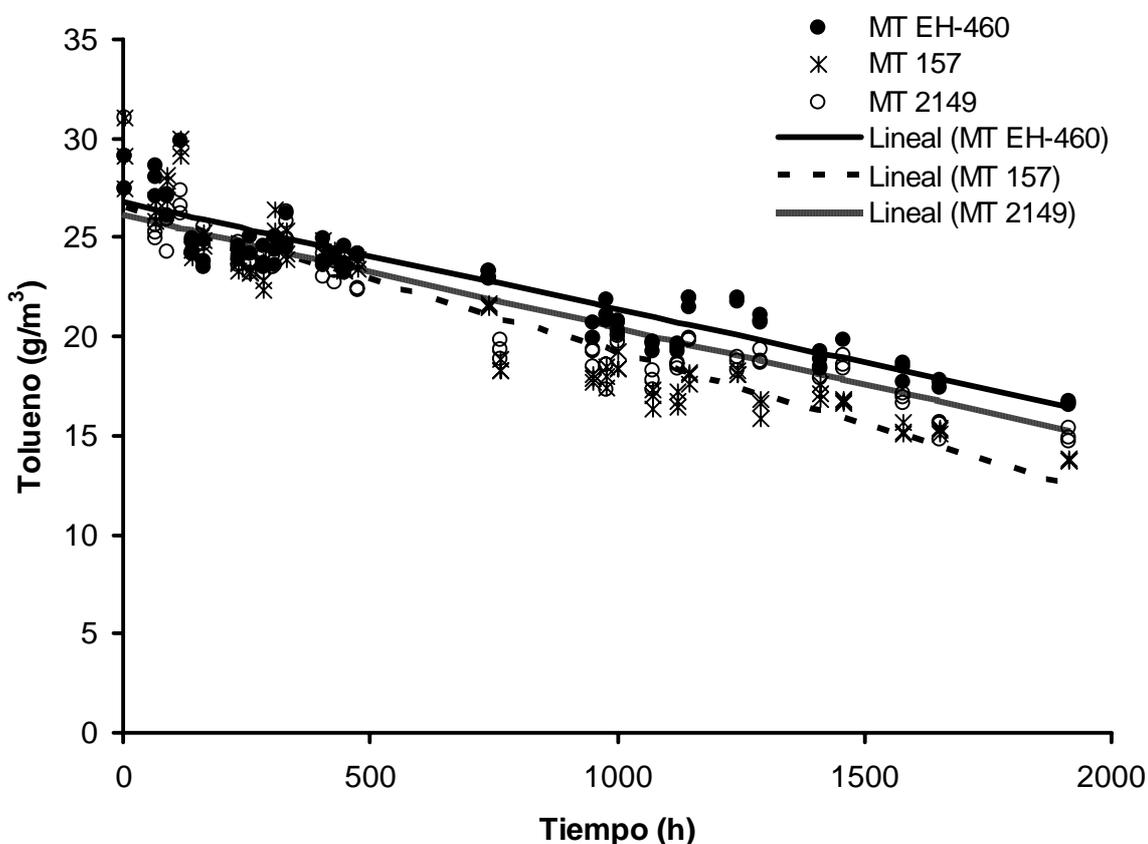


Figura 28. Consumo de tolueno en microcosmos con medio líquido de las cepas de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149.

Al determinar las concentraciones de CO₂ y O₂ en el medio (MT) no se pudo establecer una relación entre ellas y el consumo de tolueno; presentando valores CO₂ bajos o nulos con lecturas irregulares que no se ajustaron a un modelo, en cuanto al consumo de O₂ no superó al 1% (7.3×10^{-3} mmol). El comportamiento que exhibió la producción de CO₂ en

medio mineral con tolueno y n-hexano fue similar, los valores de CO₂ estuvieron por debajo de una concentración de 0.01 mmol de CO₂, que no fueron posibles de ajustar a un modelo adecuado.

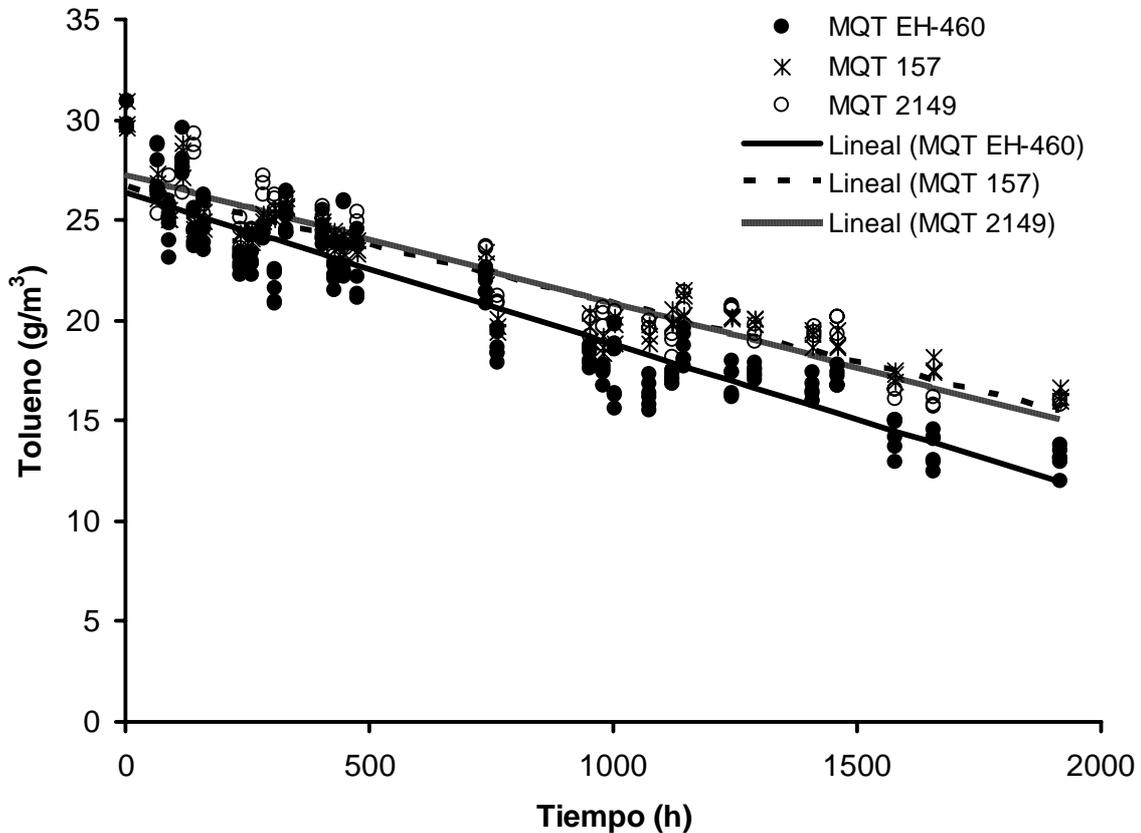


Figura 29. Consumo de tolueno en microcosmos con medio líquido y quitina coloidal de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149.

En medio mineral con quitina coloidal y tolueno (MQT) *L. lecanii* EH-460 realizó el máximo consumo de tolueno (17.0 g de tolueno/m³), con una velocidad máxima de consumo de 7.50×10^{-3} g de tolueno/m³·h. La adición de quitina coloidal en el medio afectó principalmente a la cepa 157 reduciendo su consumo a 13.8 g de tolueno/m³ y disminuyendo la velocidad de consumo (5.80×10^{-3} g de tolueno/m³·h). En *L. lecanii* 2149 la presencia de quitina coloidal no alteró el consumo de tolueno (Tabla 3), pero incrementó la velocidad de consumo (6.40×10^{-3} g de tolueno/m³·h). En general se observó un comportamiento similar en las cepas (EH-460, 157 y 2149), durante las primeras 90 a 240 h de la cinética se efectuó el mayor consumo de tolueno, continuando con un comportamiento lineal (Figura 29, Tabla 3). Mientras el pH del medio es aproximado al

inicial, se tiene que medio de cultivo líquido con quitina coloidal se alcalinizan a medida que se consume la quitina del medio (Marín *et al*, 2006).

Las cepas de *L. lecacillium* EH-460, 157 y 2149 en medio MQT presentaron una producción mas lenta de CO₂ en las primeras horas en comparación al medio MQH, teniendo la producción máxima de CO₂ *Lecanicillium* 2149 (0.18 mmol CO₂), y la mejor velocidad *L. lecanii* 157 (0.001 mmol CO₂/h), observándose en los tres casos una fase lag hasta las 68 h e iniciando la fase exponencial que vario en cada cepa, en *L. lecanii* 157 se prolongó hasta las 160 h, EH-460 hasta las 240 h y 2149 a las 260 h, tiempo en el que se observó disminución en la actividad degradadora (Figura 30, Tabla 4). Posteriormente se notó una segunda fase exponencial en la producción de CO₂, identificándose comportamiento diáuxico. Entrando a la fase de estacionaria entre las 400 a 450 h para *L. lecanii* EH-460 y 157, las 740 h *L. lecanii* 2149 (Figura 30). Realizando un consumo aproximado del 20% de O₂ (0.146 mmol), que se ajusta al modelo lineal hasta las 400 h, tiempo en que se esta inicio la face estacionaria en la producción de CO₂.

De acuerdo a los resultados la primera fuente de carbono en ser consumida es el tolueno, que se efectuó durante las primeras 90 h, tiempo que corresponde a la fase lag y el inició de la primera fase exponencial, indicando que durante las primeras 68 h solo se consumió tolueno, a partir de este tiempo se consume tanto tolueno (menor cantidad) como quitina coloidal hasta iniciar la segunda fase exponencial donde aumenta la velocidad de consumo de quitina coloidal (aproximadamente inicia a las 240 h) que continua hasta agotar la quitina del medio (Figura 29). A causa del consumo de tolueno durante las primeras horas, se tiene una menor velocidad de producción de CO₂ que en los medios con n-hexano y quitina (MQH) como se presenta en la Tabla 4.

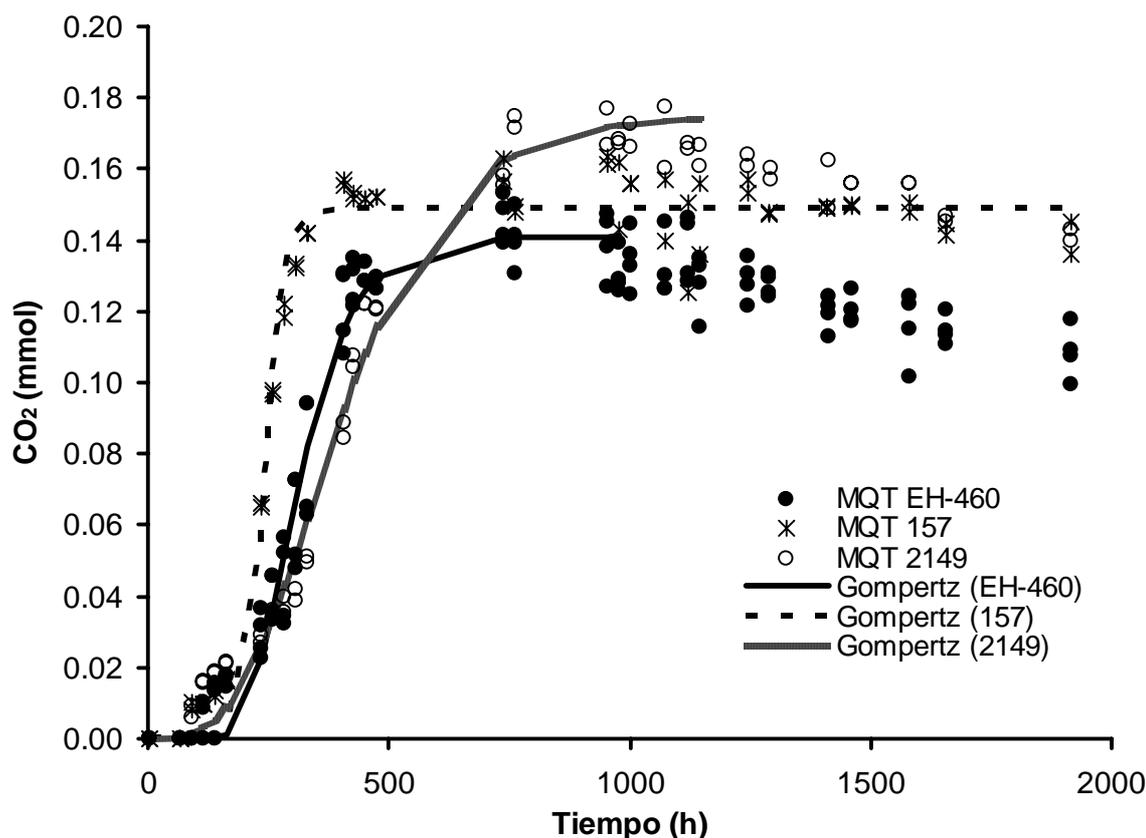


Figura 30. Producción de CO₂ por las cepas de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149, en medio mineral con tolueno y quitina coloidal como fuente de carbono.

Comparando los medios con o sin quitina coloidal adicionando tolueno o n-hexano, se tiene que las cepas de estudio mostraron mejor consumo de tolueno, además que la adición de quitina aumento la velocidad máxima y el consumo de tolueno (como se observa en la cepa 2149), con excepción de la V_{max} de 157 (Tabla 3).

Analizando estos resultados con las observaciones efectuadas en la selección de cepas en medio superficial, el tolueno tiene menor efecto inhibitorio sobre la asimilación de quitina (actividad quitinolítica) por el hongo, además de presentar el menor daño sobre la estructura de la hifa en comparación al provocado por el n-hexano (Figura 16, 17, 19 y 20). Pero en estas pruebas el consumo de tolueno como primera fuente de carbono se deber a que el tolueno es más soluble en el medio de cultivo que n-hexano, influyendo en que el consumo de n-hexano sea menor por su baja concentración en el medio de cultivo y a una represión por parte de la quitina coloidal.

La producción de CO₂ se debe principalmente al consumo de quitina, pues en medios con solo hidrocarburos (n-hexano o tolueno) la máxima producción no sobrepasó al 6 % de la detectada en medios con quitina. La concentración máxima de CO₂ la alcanzó *L. lecanii* 157 en el medio MQH, presentando la mejor velocidades de consumo de hidrocarburos (Tabla 4), esto puede deberse a la biomasa generada por el consumo de la quitina que se efectuó antes de iniciar consumo del hidrocarburo (Figura 26, 27). Las pruebas realizadas en medio superficial mostraron que *L. lecanii* 157 presentó halo de hidrólisis de quitina coloidal en presencia de n-hexano, advirtiéndose menor efecto inhibitorio en las actividades quitinolíticas (Figura 16, 17 y 19).

En los medios MQH se consumió como primera fuente de carbono a la quitina coloidal y presentando además mayor producción de CO₂ esto se puede deber como se ha discutido a la baja solubilidad de n-hexano (9.5mg/l) en medio líquido, siendo menor la concentración del hidrocarburo el hongo comienza a consumirla quitina hasta agotarla entre las primeras 160 ó 240 h (aproximadamente 7 a 10 días) momento en que inicia el consumo de la segunda fuente de carbono. En cuanto al medio MQT, al ser mas soluble el tolueno (535 mg/l) el hongo inicia el consumo de tolueno antes de emplear la quitina coloidal, modificando el consumo de esta, a lo que podría deber la menor producción de CO₂ (Figura 27, 30 y Tabla 4).

Los medios de cultivo con hidrocarburos (n-hexano o tolueno) mostraron un pH entre un intervalo de 5.6 a 5.8, indicando la formación de productos intermediarios como ácidos grasos que ligeramente acidificaron al medio (Figura 31). En los medios donde se adicionó quitina coloidal (MQT y MQH) se mantuvieron dentro del intervalo de 5.9 a 6.0 (Figura 26 y 29) cercanos a el pH inicial (6.0). Teniendo una diferencia significativa entre los tratamiento solo por la adición de quitina coloidal (Tabla AIII.26) y no habiendo diferencia entre la adición de n-hexano o tolueno al medio (Tabla AIII.27). Conforme a estudios anteriores en donde se adicionó quitina coloidal, al consumirse esta el medio se alcalinizó manteniéndose entre un pH de 6.0 a 7.0 (Marín *et al*, 2006), a lo que se debe que el pH de los medios con quitina se encontraran cercanos al pH inicial.

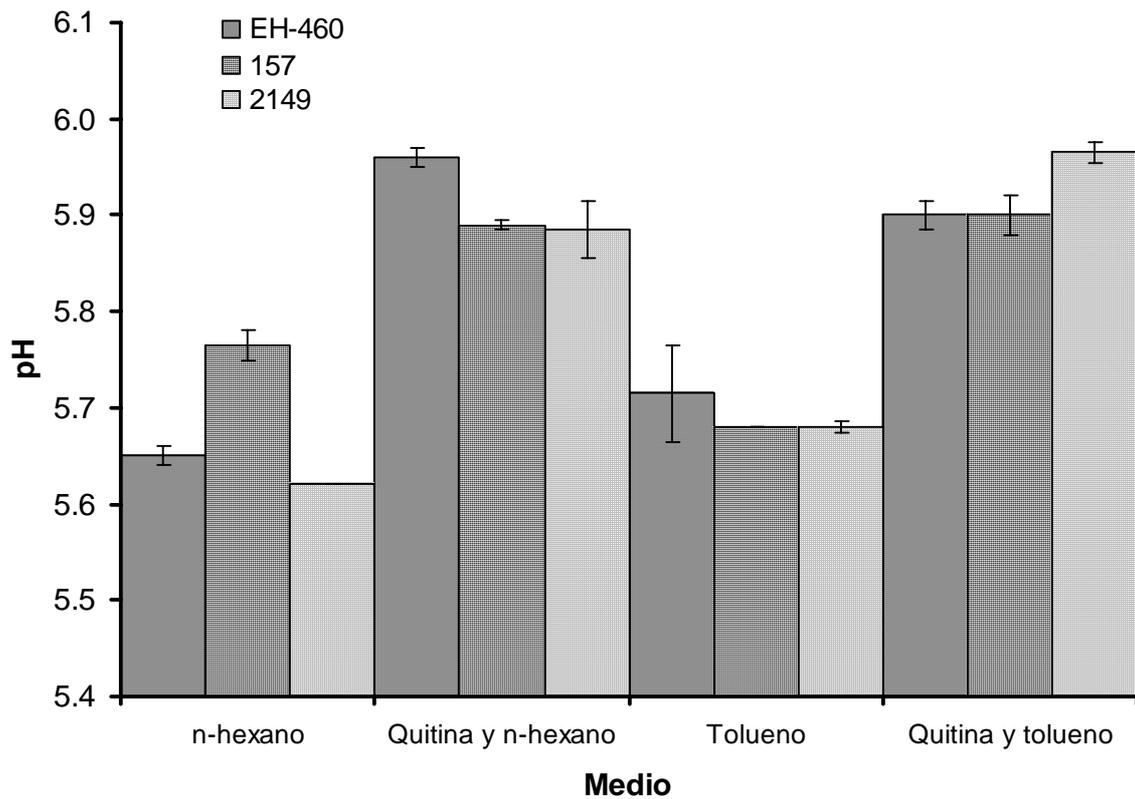


Figura 31. Mediciones de pH de medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, en microcosmos a 25°C, 180 rpm, de *L. lecanii*: EH-460, 157 y 2149. Datos promedio de 2 observaciones y error estándar de la media.

En general el medio de cultivo en todas las condiciones se mantuvo a un pH cercano al óptimo para la actividad de quitinasas (pH 5) y dentro del intervalo (pH de 5 a 8) en que se expresan las hidrofobinas (Raymond *et al*, 1998), siendo propicias las condiciones del medio para la expresión de estas proteínas.

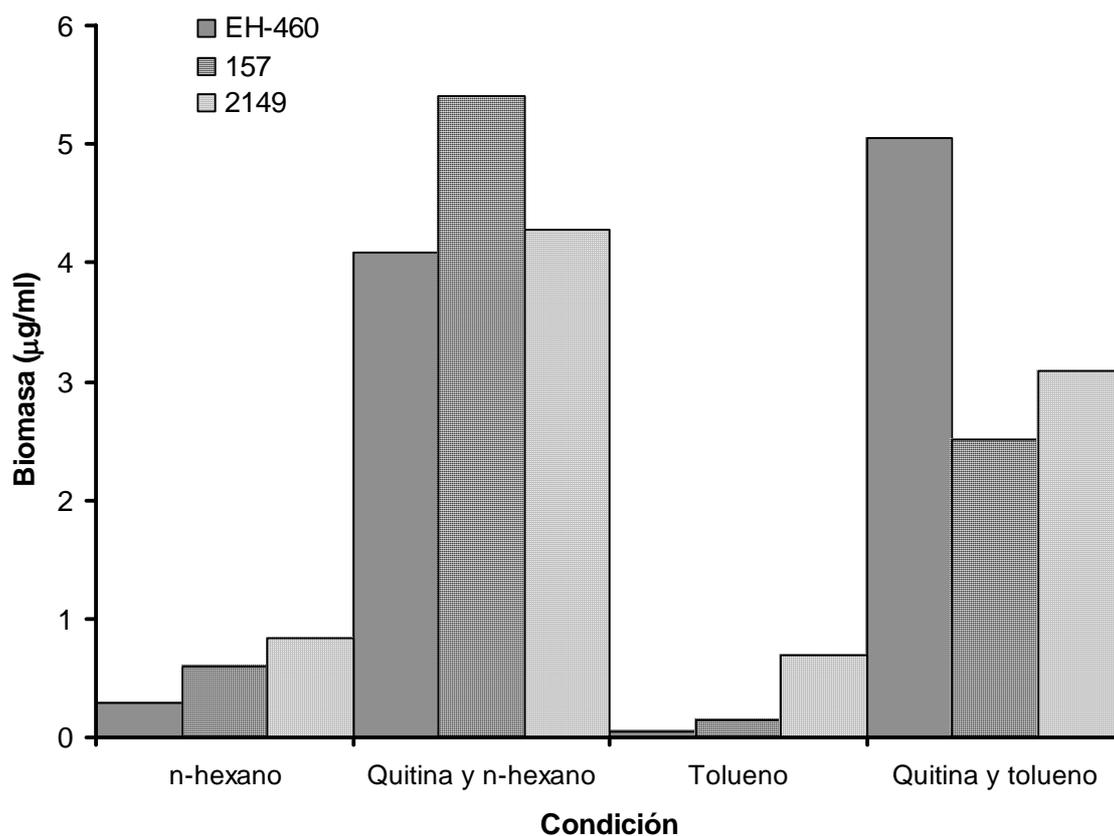


Figura 32. Biomasa (proteína total) producida en microcosmos con medio mineral variando la fuentes de carbono, a 25°C y 180 rpm de *L. lecanii* a los 80 días de incubación: EH-460, 157, 2149.

La determinación de biomasa se realizó mediante la evaluación de la proteína total por la técnica de Bradford (Figura 32). Comparando las estimaciones de biomasa realizadas en los medios con o sin quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano o tolueno), transcurrido los 80 días de incubación, el factor que varió el crecimiento fue la adición de quitina coloidal al medio de cultivo, presentando los valores más altos *L. lecanii* 157 en el medio MQH (5.40 µg de proteína/ml) y *L. lecanii* EH-460 en el medio MQT (5.05 µg de proteína/ml). En tanto los medios con solo hidrocarburo tuvieron concentraciones menores de 4 a 90 veces en comparación con los medios con quitina coloidal, Hallando a *L. lecanii* 2149 como la cepa que presentó la mayor producción de biomasa en medio MH (0.83 µg proteína/ml) y medio MT (0.69 mg proteína/ml). Indicando que la diferencia entre la concentración de proteína dependió de la fuente de carbono es de mas fácil asimilación y la cepa que se empleó (Figura 32).

L. lecanii EH-460, 157 y 2149 presentaron actividad degradadora tanto de n-hexano como tolueno, teniendo consumos dentro de un intervalo de 41% a 57% para las diferentes condiciones empleadas. La razón por la que se supone que los hidrocarburos no llegaron a ser eliminados al 100% es por la baja velocidad de consumo de *Lecanicillium* que no superó al 1×10^{-2} g/m³·h. Considerando los factores que comúnmente limitan a la degradación de n-hexano o tolueno en medio líquido está la baja solubilidad de estos (<1mg/ml), que en este caso el hidrocarburo soluble es mayor a la capacidad degradadora del hongo. El oxígeno disponible es otro factor que limita la reacción mas en estos sistemas el consumo no llegó a superar al 20% del O₂ presente en los medios en que se añadió quitina coloidal. Podría considerarse un efecto represivo por parte de la quitina coloidal que se adiciono sin embargo el consumo se incremento o disminuyo aproximadamente 6%, por lo que se podría considerar el variar la concentración y/o la fuente de carbono con el fin de mejorar la degradación así como variar las concentraciones de los nutrientes del medio para encontrar un medio de cultivo que favorezca a la degradación de los hidrocarburo (Papagianni, 2004, Arriaga *et al*, 2005)

A partir de las observaciones se tiene que la cepa 157 después de 80 días de incubación tuvo el mayor consumo de n-hexano con o sin quitina coloidal en medio mineral con 56% y 57%, respectivamente. Indicando que en esta cepa la adición de quitina coloidal como una segunda fuente de carbono no modifica el consumo. Esta cepa además presentó mayor degradación de tolueno como única fuente de carbono (53%). En medio mineral enriquecido con quitina coloidal y tolueno, la cepa *L. lecanii* EH-460 mostró un consumo de 57% del hidrocarburo. Mientras que *L. lecanii* 2149 en medio mineral con quitina coloidal y n-hexano tuvo un consumo máximo de n-hexano similar al de cepa 157, mientras que empleando tolueno (MT y MQT) mantuvo valores de consumos intermedios entre los obtenidos por 157 y EH-460, teniendo como característica principal que el consumo de tolueno fue similar tanto en los medios con o sin quitina coloidal, indicando un efecto mínimo por la adición de quitina al medio (Figuras 25, 26, 27 y 28).

VII.3.2. Evaluación de actividades quitinolíticas de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149, en presencia de n-hexano o tolueno con o sin quitina coloidal.

Se determinó las actividades de N-acetil-hexosaminidasa y endoquitinasas en el extracto enzimático, con la finalidad de identificar efecto de los hidrocarburos (n-hexano y tolueno) en la actividad quitinolítica después de 80 días de incubación.

Realizada la medición de N-acetil-hexosaminidasa (NHasa), se detectó actividad de esta enzima en los extractos enzimáticos de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149 de los tratamientos en que se adicionó n-hexano o tolueno siendo significativamente mayor la actividad en los medios con quitina coloidal e hidrocarburos que sin quitina, siendo hasta 200 veces mayor actividad de NHasa (Tabla AIII.29). La cepa de *L. lecanii* EH-460 presentó la máxima actividad volumétrica (4.03 mU/ml) y específica (1.40 U/mg de proteína) en el medio MQT. Usando hidrocarburos como única fuente de carbono la mayor actividad de NHasa se encontró en presencia de tolueno (MT) por la cepa de *L. lecanii* 2149 (0.078 mU/ml), Figura 33.

Uno de los factores que más repercutieron en la expresión de N-acetil-hexosaminidasa (NHasa) es la adición de quitina al medio de cultivo, como se ha mencionado la quitina es un reconocido inductor de quitinasas en los hongos (Matsumoto *et al*, 2004). Comparando los resultados en función del hidrocarburo, en presencia de tolueno se observa mayor actividad de NHasa al terminar la incubación que en el medio con n-hexano (Tabla AIII.30) principalmente en donde se adicionó quitina coloidal, esto se debe a que en los medios con quitina el consumo de esta fue más lento especialmente para EH-460, mientras que en los medios con n-hexano la quitina coloidal fuera la primera fuente de carbono en ser consumida y para el tiempo en que se realizó la determinación se ha perdido la actividad de NHasa, aunque no es el único factor que influye sobre la expresión de esta enzima, ya que en medios sin quitina coloidal se tuvo la expresión de estas, tanto con tolueno como con n-hexano, por tanto la presencia de estos hidrocarburos induce mecanismos quitinolíticos. Por lo tanto para la determinación de actividad de NHasa influye la fuente de carbono (quitina coloidal, tolueno o n-hexano), el tiempo en que se realizó la medición y la cepa que se emplee en el estudio.

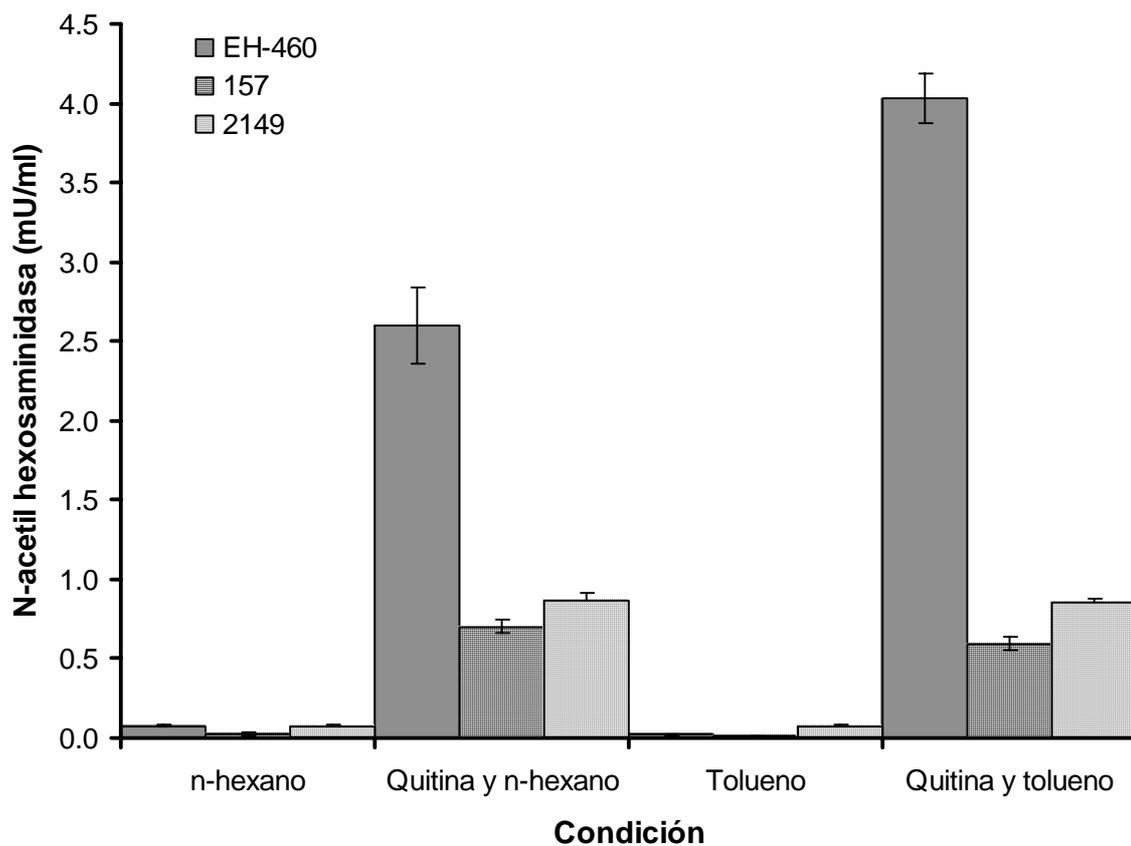


Figura 33. Actividad volumétrica de N-acetil-hexosaminidasa de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149, en medio mineral con n-hexano o tolueno con o sin quitina coloidal. Datos promedio de 8 observaciones y error estándar de la media.

La actividad quitinolítica de endoquitinasas se determinó en los medios en que se adicionó hidrocarburos (n-hexano o tolueno) con o sin quitina coloidal para las cepas de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149, observándose la mayor actividad volumétrica en la cepa 2149 en el medio MQH (6.63 U/ml) y en presencia de solo hidrocarburos en la cepa 157 no observándose diferencia significativa entre la adición de n-hexano (3.02) y tolueno (3.14), o la adición de quitina coloidal al medio de cultivo con la excepción de la cepa 2149 en el medio MQH (Figura 34, Tabla AIII.33)

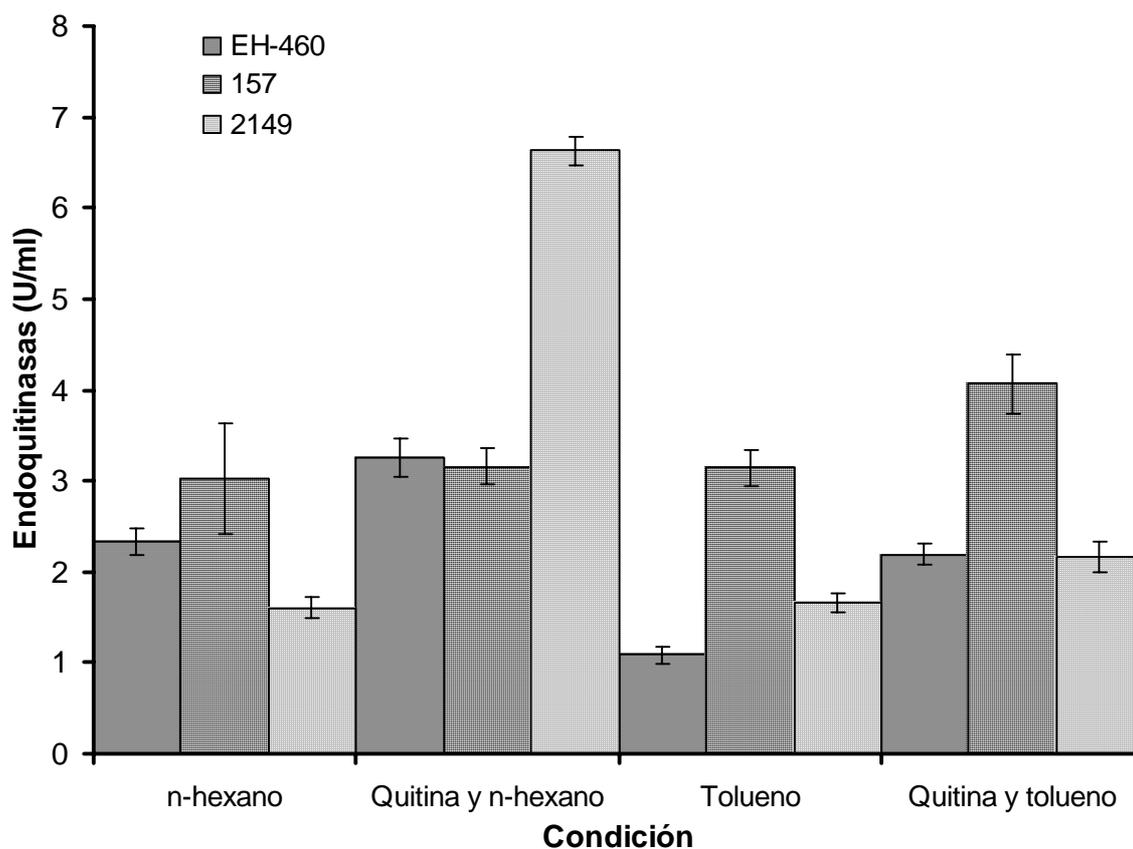


Figura 34. Actividad volumétrica de endoquitinasas de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149 en medio mineral con n-hexano o tolueno con o sin quitina coloidal. Datos promedio de 8 observaciones y error estándar de la media.

De acuerdo a los antecedentes la expresión de quitinasas (endoquitinasas y exoquitinasas) es inducida con la presencia de quitina en el medio, en el caso de las endoquitinasas el efecto de la adición de quitina no es tan marcado como fue en la actividad de NHasa (Figura 33). La diferencia significativa que se encuentra es la utilización de quitina coloidal y n-hexano como fuente de carbono (Tabla AIII.33). La razón por la que las actividades de los medios con o sin quitina son similares se debe a que la quitina coloidal es consumida entre las 240 h (MQH) y 420 h (MQT) (Figura 30), disminuyendo la actividad de endoquitinasas para el tiempo en que se realizó la determinación. Sumando a que en el medio que solo se adicionó el hidrocarburo se observó la expresión de estas, indicando que las enzimas quitinolíticas se inducen también por la presencia del hidrocarburo (Figura 34). Se puede considerar que esta enzima esta relacionada con la actividad degradadora.

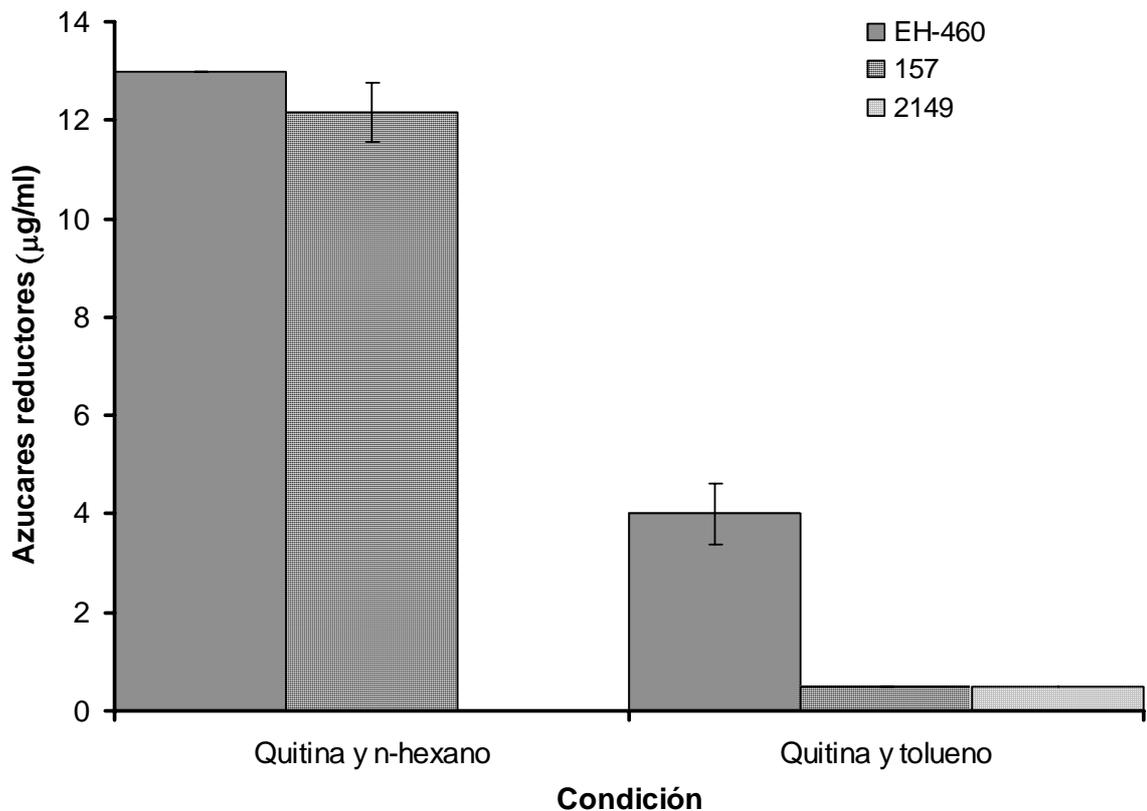


Figura 35. Concentración de azúcares reductores determinados en medio líquido con quitina coloidal e hidrocarburos (n-hexano y tolueno) a 25°C, 180 rpm, de *L. lecanii* EH-460, 157 y 2149. Datos promedio de 6 observaciones y error estándar de la media.

En los extractos enzimáticos de los medios con quitina coloidal se midió la concentración de azúcares reductores con la finalidad de determinar productos de hidrólisis por actividades quitinolíticas. Estos azúcares fueron detectados en los medios con tolueno (MQT) y n-hexano (MQH). La mayor concentración fue cuantificada con *L. lecanii* EH-460 en el medio quitina con hexano (13.0 μg de azúcares reductores/ml), mientras que en presencia de tolueno se encontró una concentración 70% menor (Figura 35).

Comparando estos resultados con las mediciones de actividad enzimática, la cepa *L. lecanii* EH-460 en el medio MQH, presentó la mayor actividad de N-acetilhexosaminidasa, además de realizar un consumo más lento de quitina coloidal que las otras cepas en esta

condición, se puede suponer que los azúcares reductores presentes son producto de la actividad de NHasa sobre la quitina coloidal aun presente (Figura 33).

De las observaciones que se tienen, se puede decir que la adición de hidrocarburos al medio de cultivo ya sea tolueno o n-hexano, induce la expresión de quitinasas, principalmente la de endoquitinasas.

VII.4. Determinación del efecto de hidrocarburos en la actividad quitinolítica de *Lecanicillium lecanii* 2149 en microcosmos.

Con el objetivo de estudiar el efecto de los hidrocarburos sobre la actividad quitinolítica (endoquitinasas y exoquitinasas) de un hongo entomopatógeno y los mecanismos relacionados, se decidió utilizar como hidrocarburo a tolueno, que según los resultados anteriores es la fuente de carbono que se consumió primero, además de presentar un menor daño sobre la estructura de la hifa. En tanto que *L. lecanii* 2149 fue elegida para estas determinaciones por su capacidad degradadora de este hidrocarburo (VII.3).

Por lo que se creció a *L. lecanii* 2149 en medio mineral empleando como fuente de carbono: quitina coloidal (MQ), quitina coloidal y tolueno (MQT), y tolueno (MT), a 25°C y 180 rpm por 26 días. Para determinar el crecimiento de *L. lecanii* 2149 se realizaron mediciones de proteína total (VI.2.8), ajustando estos datos al modelo de Gompertz (Tabla 5).

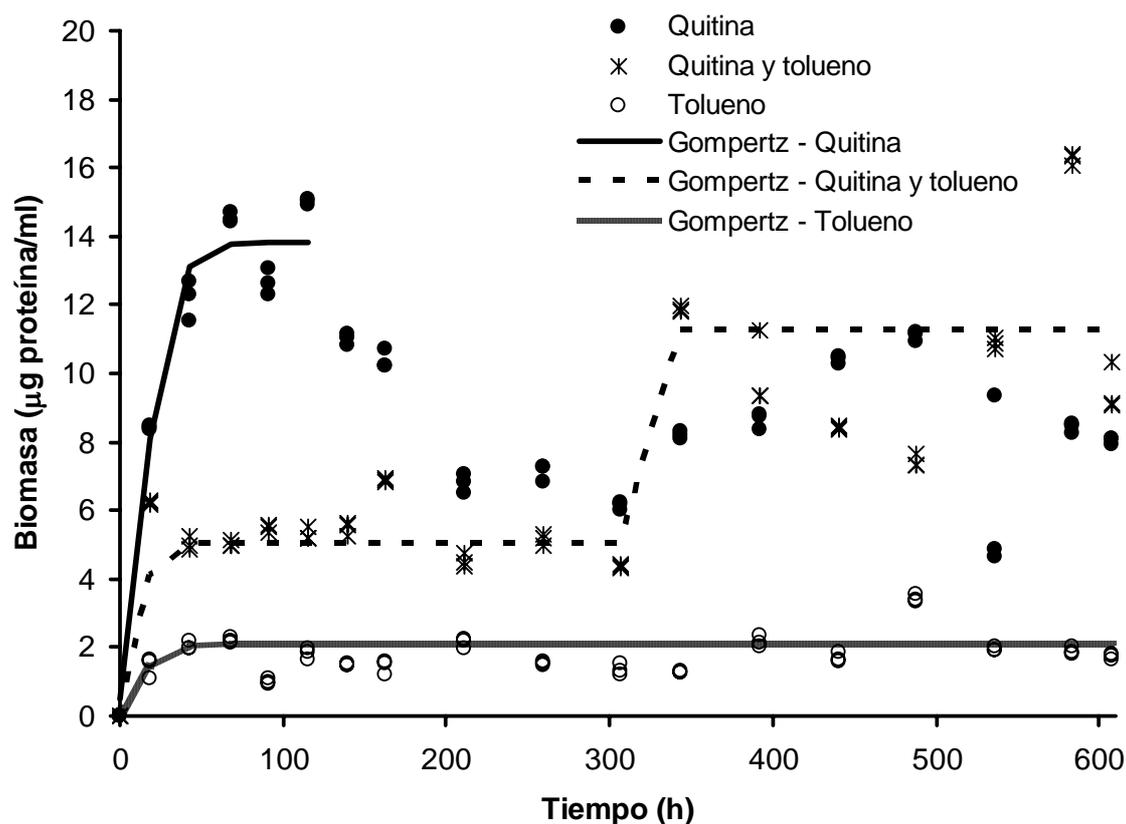


Figura 36. Curvas de biomasa (proteína total) de *L. lecanii* 2149, en medio mineral con o sin quitina coloidal, y/o tolueno como fuente de carbono a 25°C y 180 rpm.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de *L. lecanii* 2149, en medios de cultivo con o sin quitina o tolueno.

Condición	X_{max} (µg de proteína/ml)	k (h ⁻¹)	R ²	V_{max} (µg proteína/h)	X_0 (µg de proteína/ ml)
MQ	13.84	0.0969	0.9691	0.4935	0.4935
MQT	5.05	0.2178	0.9456	0.4047	0.4047
MQT (Curva2)	11.24	0.9200	0.9647	3.8042	0.0000
MT	2.12	0.1338	0.9607	0.1041	0.1041

* Ajustados al modelo de Gompertz.

MQ – medio mineral con quitina coloidal, MQT- medio mineral con quitina coloidal y tolueno, MT – medio mineral con tolueno.

Examinando el comportamiento del hongo en medio mineral empleando como fuente de carbono quitina coloidal, quitina coloidal y tolueno o tolueno, se observó que la velocidad de crecimiento de 2149 fue mayor en el medio con quitina (0.0969 h⁻¹), llegando a la fase

estacionaria a las 68 horas de incubación. Entretanto el medio con tolueno presentó una velocidad de consumo de 0.1338 h^{-1} llegando a la fase estacionaria a las 43 h, diferencia debida a la fuente de carbono. Al adicionar las dos fuentes de carbono (quitina coloidal y tolueno) al medio de cultivo el hongo presentó un comportamiento diauxico, que indica que se consume primero el tolueno y quitina aumentando después la velocidad de consumo de la quitina (Figura 28 y 29), correspondiendo la producción de CO_2 del medio MQT (Figura 30), el mayor consumo de tolueno se realiza en las primeras 90 h observando una fase lag, ya que la cantidad de CO_2 producido al degradar el hidrocarburo no es lo suficiente para ser detectada por el equipo, después de empezar la primera fase exponencial entre las 70 y 160 h se realizó el consumo tanto de quitina coloidal como tolueno, en el momento en que esta se hace estacionaria e inicia la segunda fase exponencial (160 a 760 h) en la producción CO_2 el hongo se encuentra asimilando la mayor parte de quitina del medio presentando un incremento en la biomasa hasta las 450h. Presentando una V_{\max} de $0.4 \mu\text{g proteína/h}$ en las primeras 300 h tiempo en que se consumió de tolueno y quitina coloidal, después de este tiempo se incrementó el consumo de quitina coloidal aumentando la V_{\max} ($3.8 \mu\text{g proteína/h}$) ya que el efecto del hidrocarburo presente a disminuido o se tiene una adaptación del hongo (Figura 36).

Durante las primeras 100 h del desarrollo del hongo se realizó su máxima excreción de proteína en medio de cultivo, siendo mayor la concentración presente en los medios en que se adiciono quitina coloidal que en medio con solo tolueno como única fuente de carbono. La mayor concentración de proteína fue determinada en el medio con quitina a las 91 h ($6.1 \mu\text{g proteína/ml}$), tiempo en que el hongo esta iniciando el estado estacionario y tiene la mejor actividad tanto de N-acetil-hexosaminidasa y endoquitinasas. En cuanto al medio con quitina y tolueno la máxima concentración de proteína se tuvo a las 19 h ($5.2 \mu\text{g proteína/ml}$) tiempo en que se inicia la primera fase estacionaria y que aun no se ha iniciado el consumo de quitina coloidal pero se tiene la actividad de las quitinasas determinadas. Con tolueno como fuente de carbono la máxima concentración de proteína se presentó a las 68 horas ($1.8 \mu\text{g proteína/ml}$), momento en el que se ha llevado el consumo de tolueno, según la curva de consumo (Figura 31, 32 y 33), notando que al igual que las otras condiciones, se inicial la fase estacionaria y se detecta la expresión de enzimas quitinolíticas (Figura 37).

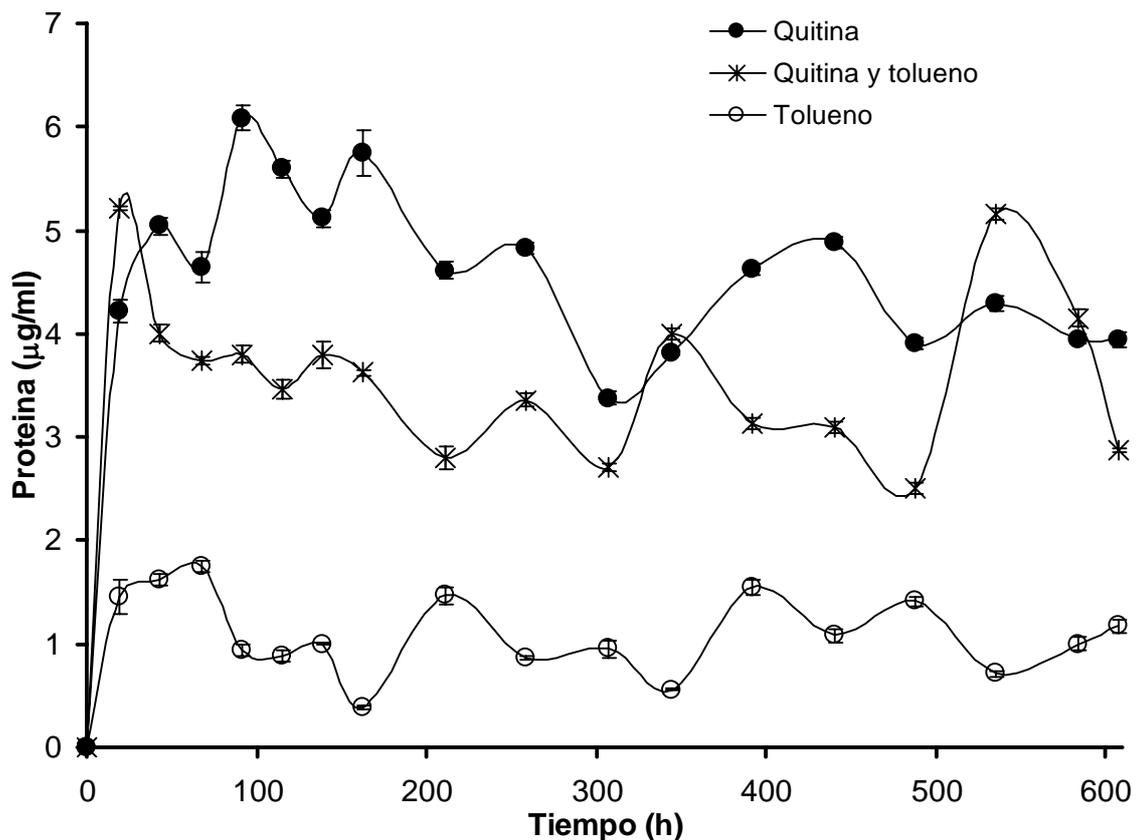


Figura 37. Concentración de proteína soluble a través del tiempo de *L. lecanii* 2149, en medio mineral con o sin quitina coloidal y/o tolueno a 25°C y 180 rpm. Datos promedio de 4 observaciones y error estándar de la media.

En los medios de cultivo se observó una disminución general del pH a medida que transcurrió el tiempo, manteniéndose entre un rango de 6.05 y 5.46. El medio MQ el pH disminuyó a partir de las 19 h hasta de un pH de 5.46 mostrándose irregular durante la cinética, pero conservándose en varios puntos a un pH de 6. En el medio MQT el pH disminuyó en las primeras horas estando entre un rango de 5.60 y 5.55 durante el tiempo de incubación, el pH en el medio MT disminuyó manteniéndose entre 5.9 y 5.8, con estos datos se puede decir que los medios con tolueno tuvieron una rápida disminución de pH por la formación de productos secundarios como ácidos carboxílicos, mas el medio control tuvo una disminución mayor en el pH por lo que no se puede confirmar que la acidificación del medio se deba a causa de productos secundarios de la degradación del tolueno sino mas de la quitina coloidal (Figura 38).

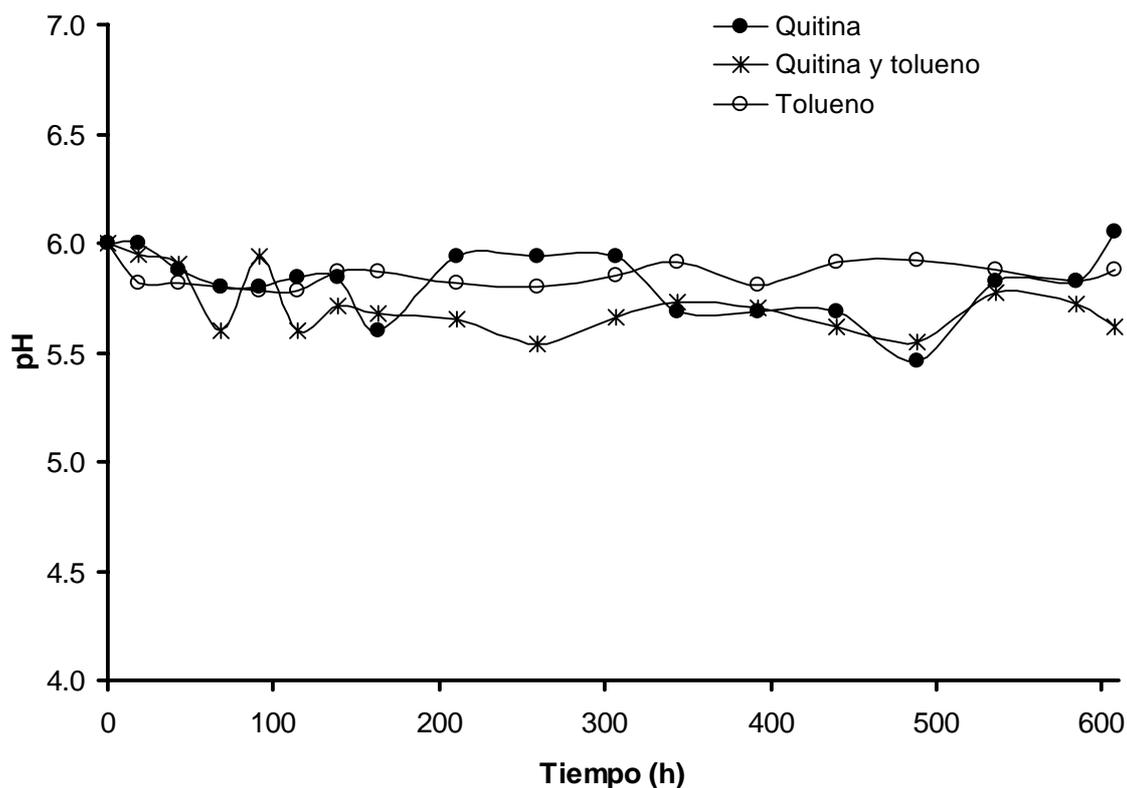


Figura 38. pH a través del tiempo de medio mineral con *L. lecanii* 2149 a 25°C y 180 rpm, con sin quitina coloidal, y/o tolueno.

En estudios previos se observó que *L. lecanii* 2149 presenta actividad quitinolítica a los 80 días de incubación en medio mineral y tolueno con o sin la adición de quitina coloidal (Figura 28 y 29). Con la finalidad de medir el efecto del tolueno sobre la actividad de enzimas quitinolíticas (endoquitinasas y N-acetil-hexosaminidasa), se empleó el medio MT y MQT. Esperando observar el cambio que pueda presentar la actividad quitinolítica en el medio ante la adición de tolueno con la presencia de un inductor como es la quitina coloidal.

Medio mineral con quitina coloidal (MQ) se empleó como control, ya que la quitina es conocida como inductor de actividad quitinolítica. El medio MQ tuvo la mayor actividad tanto volumétrica (16.70 mU/mg de proteína) como específica (2740 mU/mg de proteína) de N-acetil-hexosaminidasa a las 91 h, con un rendimiento de 1.18 U/mg de proteína. Teniendo también a las 91 h la máxima actividad volumétrica de endoquitinasas (23.18 U/ml) y un rendimiento de 1223 U/mg de proteína (Figura 39 y Tabla 6).

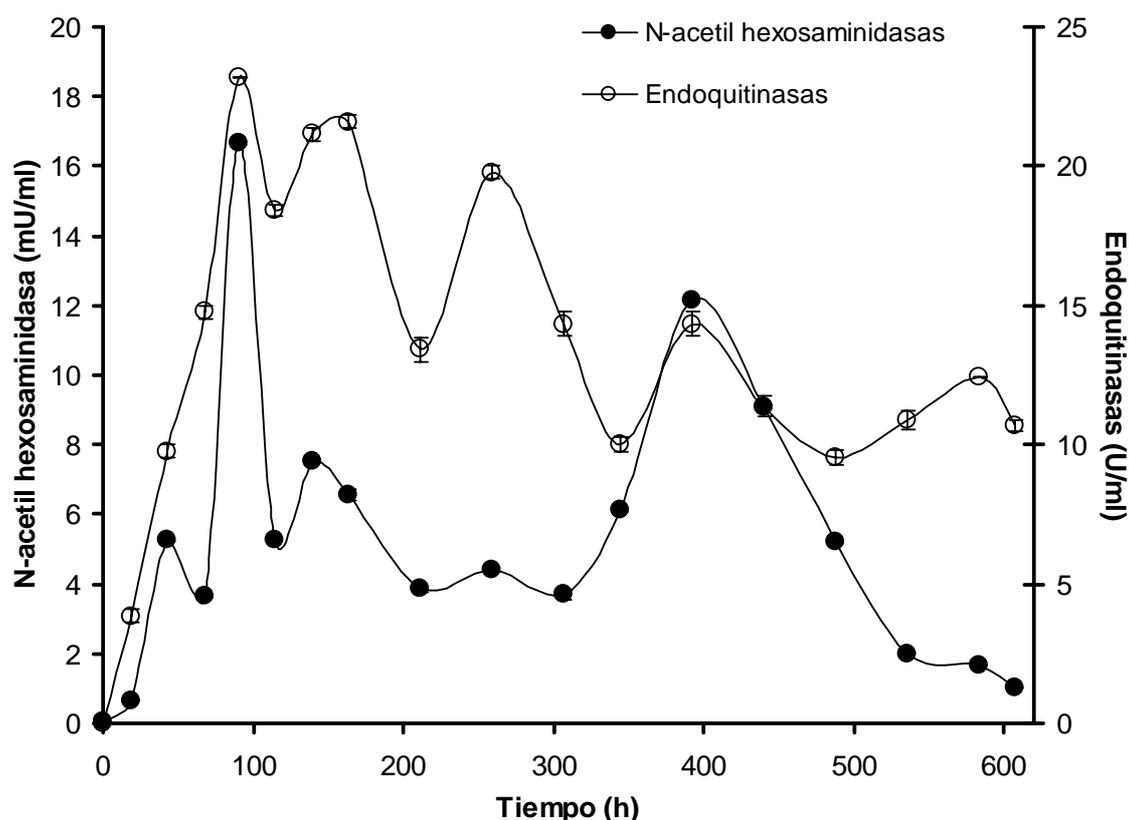


Figura 39. Actividad quitinolítica (volumétrica) de *L. lecanii* 2149 en medio mineral con quitina coloidal en microcosmos a 25°C y 180 rpm. Datos promedio de 4 observaciones y error estándar de la media.

Al medir la actividad de N-acetil-hexosaminidasa (NHase) de *L. lecanii* 2149 en los medios con tolueno, se observó una actividad tanto volumétrica como específica menor a la del medio control desde las primeras horas de incubación (19 h). Poseyendo una actividad volumétrica mayor el medio MQT (hasta de 80%) que el medio con tolueno, alcanzando una actividad máxima de NHase a las 536 h (1.48 mU/ml), al igual que la específica (2.74 U/mg de proteína) con un rendimiento de 130 mU/mg de proteína, tiempo en que el crecimiento del hongo se encuentra en estado estacionario, mostrando un aumento en la proteína excretada al medio, además de estar en la segunda fase exponencial de la curva de producción de CO₂. En tanto el medio MT presentó la mayor actividad volumétrica a las 440 h (0.27 mU/ml) y actividad específica a las 163 h (0.52 U/mg de proteína) tiempo en que se observó el consumo de tolueno y aumento en la concentración de proteína, teniendo un rendimiento de 90 mU/mg de proteína. (Figura 40, Tabla 6).

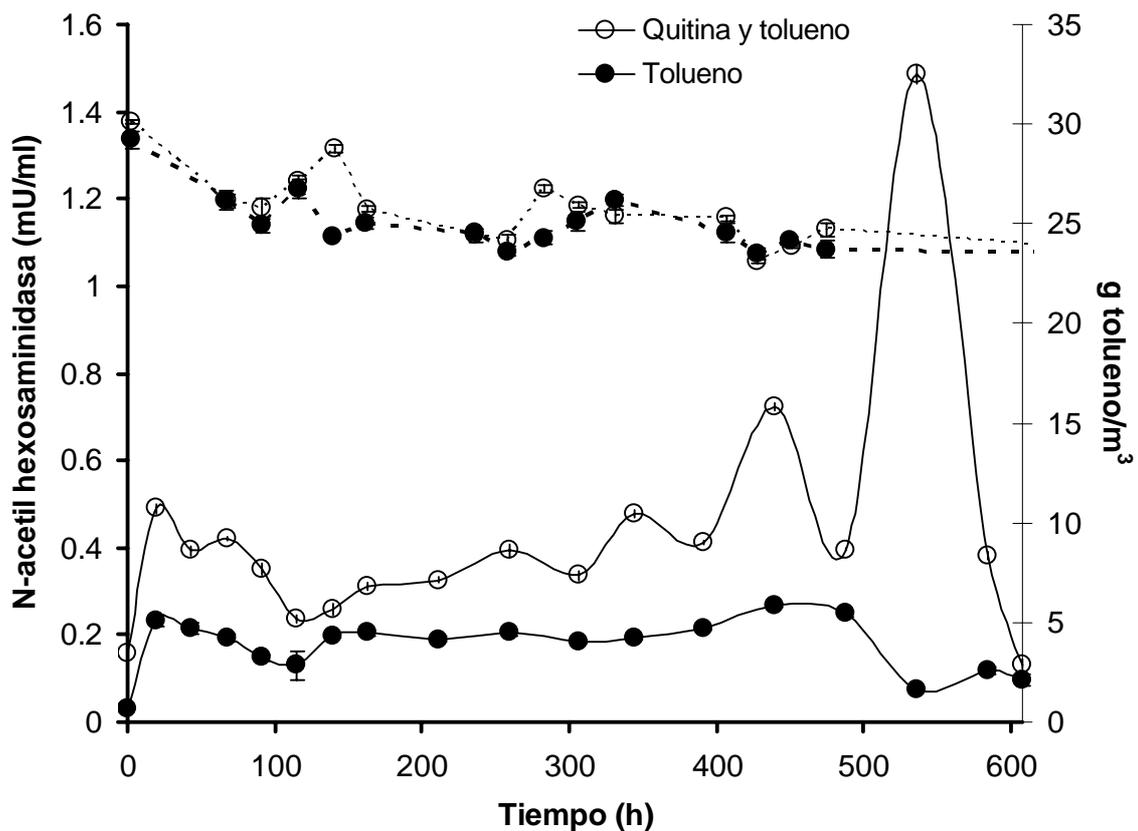


Figura 40. Actividad volumétrica de N-acetil-hexosaminidasa (líneas continuas) y consumo de tolueno (líneas puntuadas) de *L. lecanii* 2149. Datos promedio de 3 a 4 observaciones y error estándar de la media.

Comparando la actividad de NHasa de los medios quitina se observa una disminución hasta del 98% de la actividad volumétrica por la adición de tolueno al medio, por consiguiente la actividad de NHasa es modificada por la presencia de tolueno, ya que la actividad volumétrica o específica del medio MQT es mas aproximada a la del medio MT, existiendo por tanto otro sistema que permita la asimilación de la quitina coloidal o de oligómeros formados ya que de acuerdo a las curvas de CO₂ y crecimiento no se deja de consumir esta (Figura 30 y 36).

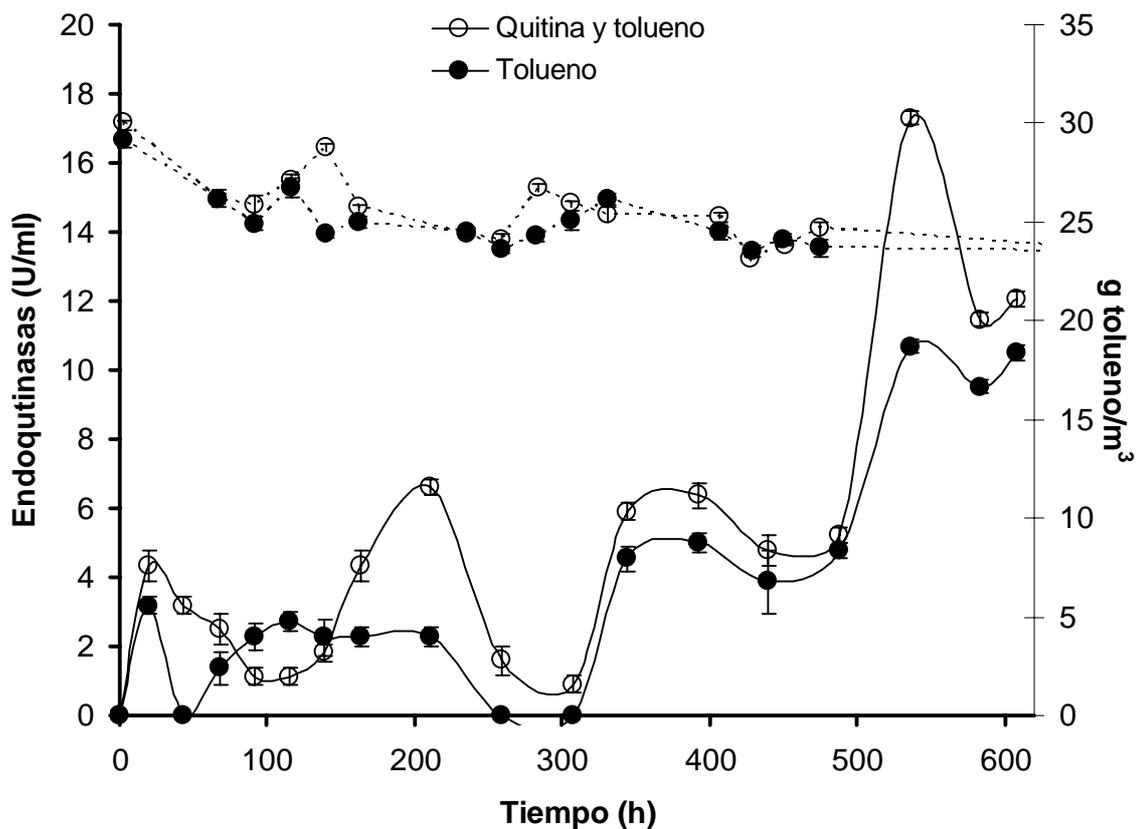


Figura 41. Actividad volumétrica de endoquitinasas (líneas continuas) y consumo de tolueno (líneas punteadas) de *L. lecanii* 2149. Datos promedio de 3 a 4 observaciones y error estándar de la media.

Al comparar las determinaciones de actividad de endoquitinasas de los medios con tolueno con respecto al control, se observó la máxima actividad volumétrica en el control a las 91 h (23 U/ml) en tanto que en los medios con tolueno se tuvo a las 536 h (17 U/ml para MQT y 11 U/ml para MT), poseyendo mayor actividad volumétrica de endoquitinasas en medios donde se tiene la presencia de quitina coloidal, principalmente en el medio control. Considerando que la proteína presente en los medios MT y MQT es menor a la determinada en el medio MQ (Figura 38), la actividad específica aumento principalmente en el medio MT. Examinando la actividad específica de endoquitinasas se tiene un comportamiento diferente a la actividad volumétrico, no mostrando tanta diferencia en la actividad específica del medio control y MQT. Teniendo un rendimiento en el medio MQT de 1303 U/mg de proteína y de 5068 U/mg de proteína en el medio MT (Figura 41 y Tabla 6).

Tabla 6. Rendimientos enzima-biomasa de la cepa *L. lecanii* 2149, en microcosmos con medio mineral, con diferentes fuentes de carbono, a 25°C y 180 rpm.

Medio	$Y_{(NHasa/X)}$ (mU/mg de proteína)	R^2	$Y_{(Endoquitinasas/X)}$ (U/mg de proteína)	R^2
MQ	1180	0.99	1223	0.99
MQT	130	0.99	1303	0.99
MT	90	0.99	5068	0.99

MQ – medio mineral con quitina coloidal, MQT- medio mineral con quitina coloidal y tolueno, MT – medio mineral con tolueno.

A partir de las mediciones de actividad quitinolítica se puede decir que la adición de tolueno al medio de cultivo con quitina modificación en la actividad de N-acetil-hexosaminidasa y endoquitinasas a partir de las 19 h. poseyendo un comportamiento similar entre los medios con tolueno con y sin quitina. La utilización de tolueno como única fuente de carbono induce la actividad quitinolítica, aumentando los rendimientos de endoquitinasas en *L. lecanii* 2149 respecto a los medios en se adicionó quitina coloidal (Tabla 6). El tolueno como fuente de carbono además podría estar induciendo otros mecanismos que permita la asimilación de la quina, ya que en el medio con quitina coloidal y tolueno la actividad de NHasa fue menor al control asemejándose al medio MT (Tabla 6).

La máxima concentración azúcares reductores en el medio con quitina coloidal (control) se tuvo a las 139 h (13.8 µg/ml) tiempo tras el que se observó la mayor actividad de NHasa en esta condición, en cuanto al medio con MQT la presentó a las 68 horas (26.3 µg/ml) tiempo que se encuentra en la primera fase exponencial en la producción de CO₂ y en que se observó actividad de NHasa y endoquitinasas. (Figura 42).

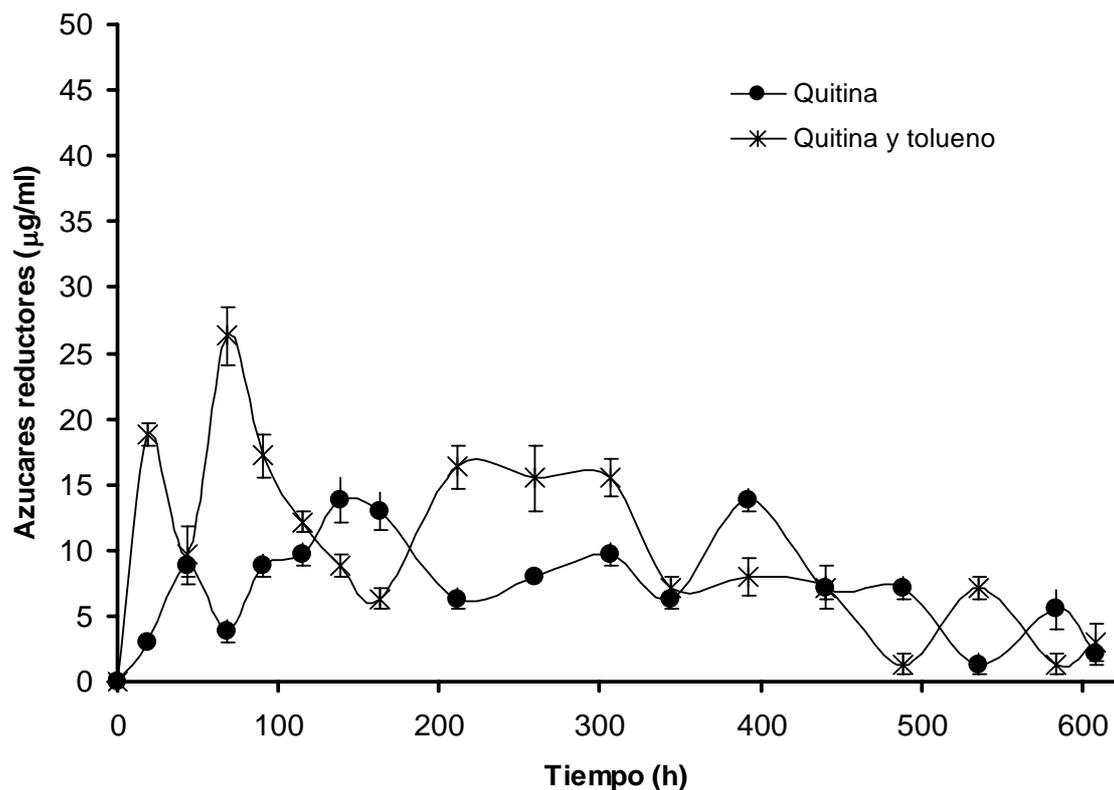


Figura 42. Concentración de Azúcares reductores liberados por *L. lecanii* 2149, en microcosmos con medio mineral con quitina coloidal con o sin tolueno a 25°C, 180 rpm. Datos promedio de 3 observaciones y error estándar de la media.

VII.5 Determinación de la expresión de hidrofobinas.

A partir de las pruebas realizadas en medio líquido (VII.1 y VII.3), la cepa seleccionada para analizar la expresión de las hidrofobinas fue *Lecanicillium lecanii* 2149, debido a que presentó actividad degradadora de n-hexano, tolueno o la mezcla de ambos, siendo probada en cultivo sumergido y medio superficial, en medios con o sin quitina coloidal.

L. lecanii 2149 fue inoculado en medio mineral con fructosa o glucosa (VI.3.1), al finalizar el tiempo de incubación (7 días) el hongo se había desarrollado adherido a las paredes del matraz (Figura 43c).

Se ha comentado que la capacidad que tienen los hongos para desarrollarse sobre superficies hidrofóbicas es debido a la presencia de las hidrofobinas. Lugones *et al*, (1998)

reportaron que *Schizophyllum commune* al crecer en medio líquido contenido en vasos de precipitados formó hifas aéreas adheridas en las paredes del vaso por arriba de la superficie del medio (Figura 43a), comportamiento que debido a la excreción de la hidrofobina SC3. Ratificándolo al eliminar el gen de esta hidrofobina (SC3) en *S. commune*, al crecer el hongo en medio líquido no podía formar hifas aéreas o de manera muy escasa, no desarrollándose fuera del medio de cultivo y sin adherirse a la superficie del vaso de precipitado (Figura 43b). Comparando el crecimiento de *L. lecanii* 2149 con el descrito por *S. commune* en medio líquido, se encontró una similitud en el desarrollo del micelio aéreo que puede ser indicio de que se está llevando la expresión de una hidrofobina en este hongo (Figura 43c).

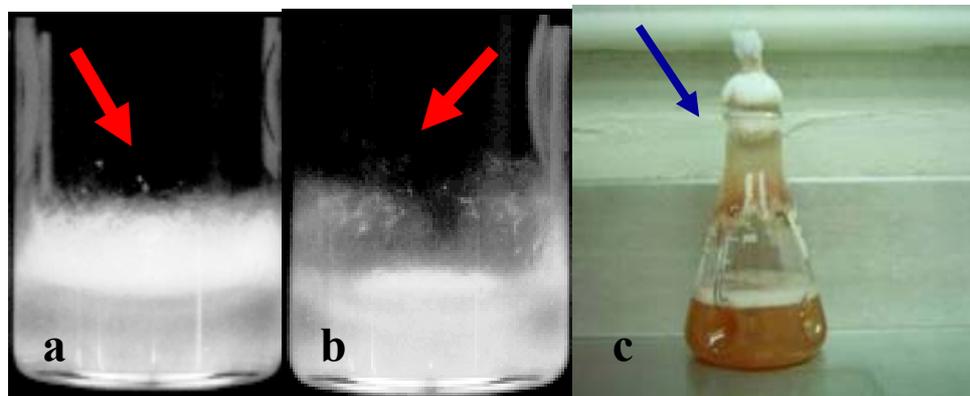


Figura 43. Desarrollo de micelio aéreo de *Schizophyllum commune* y *Lecanicillium lecanii* 2149 en medio de cultivo líquido: a) *S. commune*; b) *S. commune* con eliminación del gen de hidrofobina SC3; (Lugones *et al*, 1998); b) *L. lecanii* 2149.

VII.5.1. Implementación de las técnicas para determinar la expresión de la hidrofobina SC3: Aislamiento de ARN y RT-PCR.

La biomasa de *L. lecanii* 2149 de medio control A y B (VI.3.1) fue recolectada después del tiempo de incubación (7 días), realizando la extracción de ARN en esta de acuerdo a la metodología antes mencionada (VI.3.2). Separados los ARN por electroforesis correspondiente se observó la presencia de los ARN 18s y 28s como indicadores de que no hay degradación del ARN, según se muestra en la figura 44.

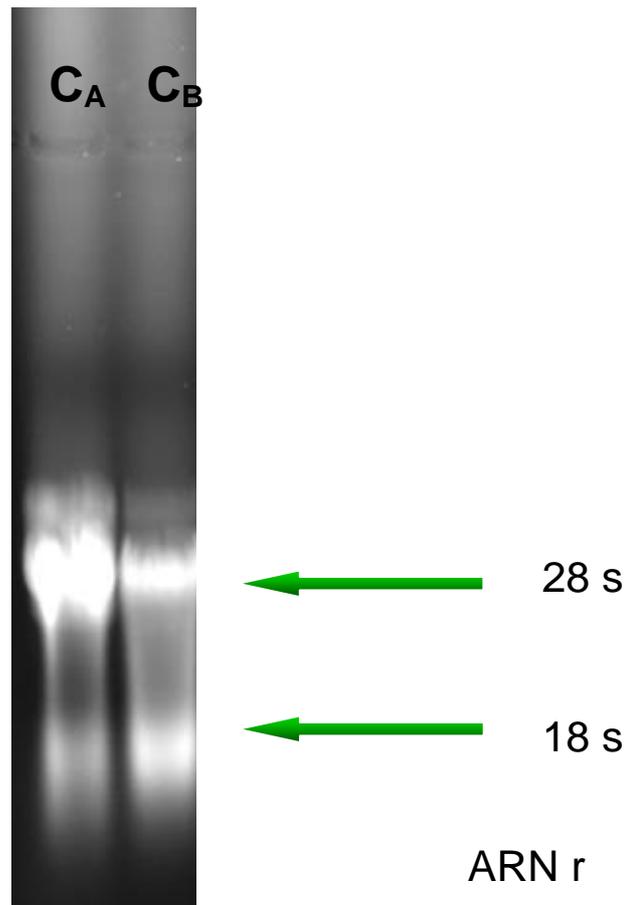


Figura 44. Electroforesis de ARN extraído de *Lecanicillium lecanii* 2149 de medio control A (C_A) y control B (C_B).

C_A – Medio mineral con extracto de levadura y fructosa; C_B – Medio mineral con extracto de levadura y glucosa

A partir del ARN total, se realizó la retrotranscripción (RT) para la obtención de cADN (VI.3.3) que se empleó para realizar la amplificación por medio de la técnica reacción en cadena de polimerasa (PCR). Primero se amplificó el gen de normalización (VI.3.4) establecido para el laboratorio (Ciclofilina), con los cebadores de este gen (AII.6) obteniéndose la expresión cuyo producto de PCR se visualizó como una banda aproximadamente de 457 pares de bases, que corresponde a la amplificación de ciclofilina (Figura 45).

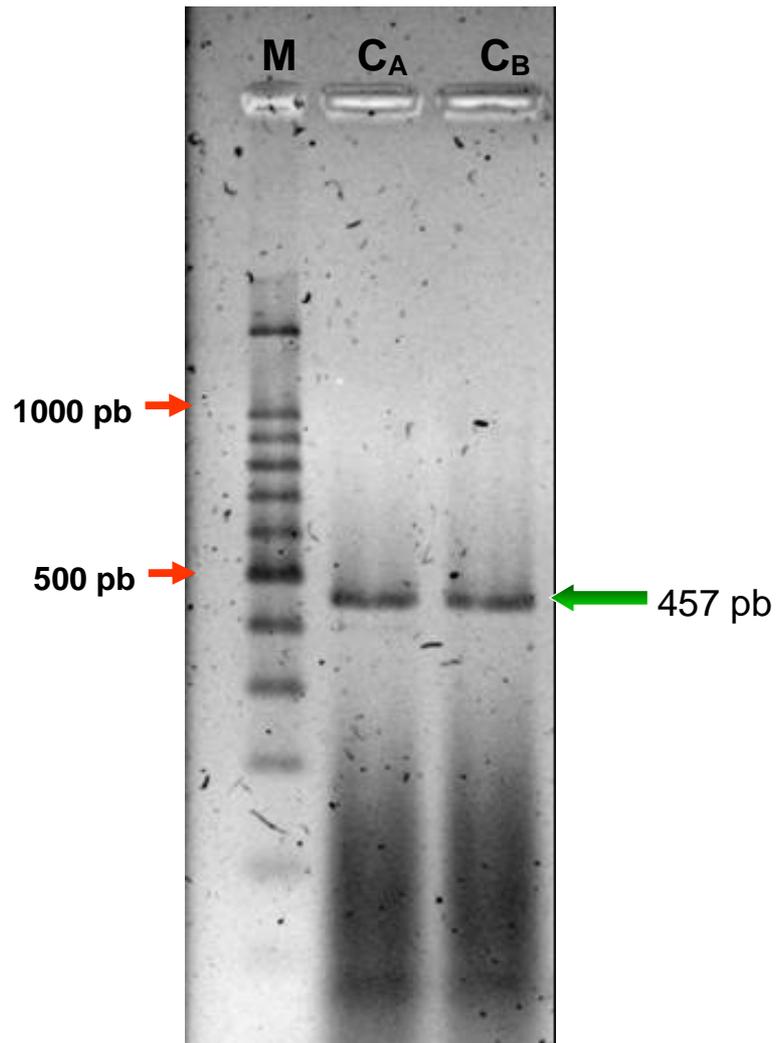


Figura 45. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos para el gen de ciclofilina, controlado con el medio control A (fructosa) y control B (glucosa).

M – Marcador de peso molecular;
 C_B -producto de PCR de medio con

49.
 medio control A (fructosa);

Una vez realizada la técnica de SC3 (AII.6) se observaron dos productos de PCR en el gel de electroforesis de los productos de PCR obtenidos para el gen de hidrofobina, una localizada ligeramente arriba de la banda de 500 pb del marcador molecular y otra localizada ligeramente abajo de los cebadores del gen de hidrofobina (412 pb), lo que indicaría que el producto obtenido sería el esperado. Esto podría señalar la expresión de ARNm que codifica para una hidrofobina de 2149 similar a la hidrofobina SC

productos del gen de hidrofobina en el gel de electroforesis de los productos de PCR obtenidos para el gen de hidrofobina (fructosa), una localizada ligeramente arriba del marcador molecular. Al emplear los cebadores del gen de hidrofobina (412 pb), lo que indicaría que el producto obtenido sería el esperado. Esto podría señalar la expresión de ARNm que codifica para una hidrofobina en el hongo *L. lecanii*. Por lo tanto, también se observa un

producto inespecífico de mayor peso molecular que podría eliminarse al reducir la concentración de cloruro de magnesio o al aumentar la temperatura de alineamiento en la PCR.

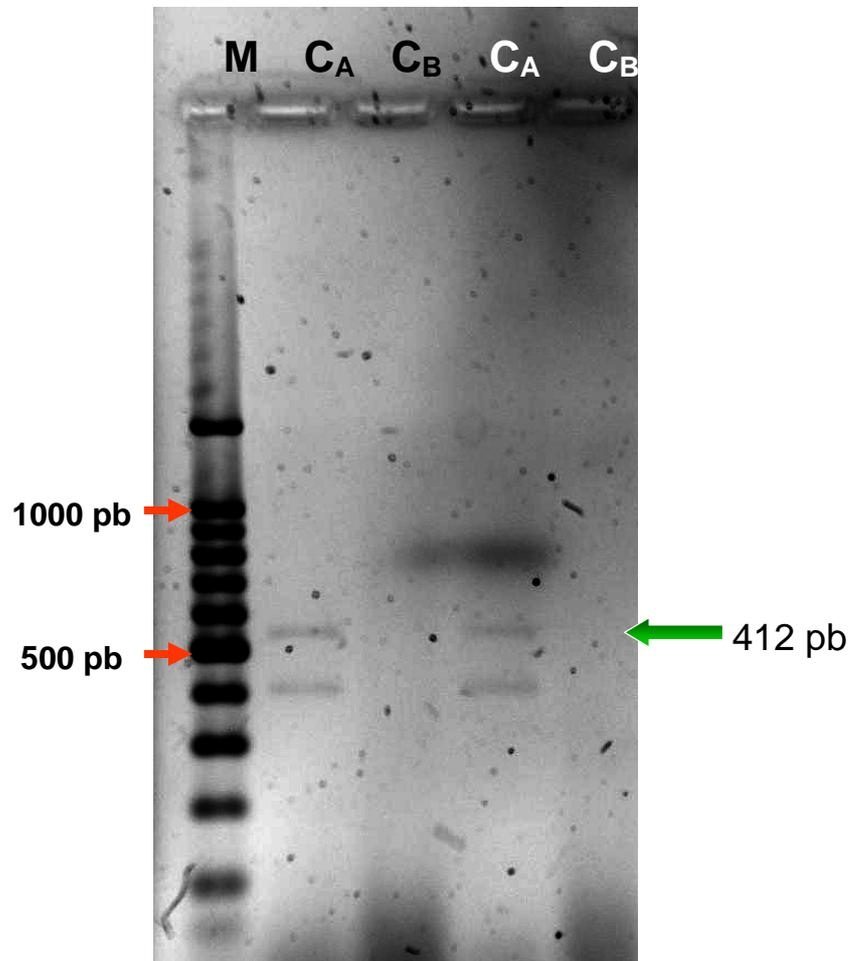


Figura 46. Electroforesis de los productos de PCR amplificados para el gen de hidrofobina SC3, de *Lecanicillium lecanii* 2149.

M – Marcador de peso molecular; C_A - producto de PCR de medio control A (fructosa); C_B - producto de PCR de medio control B (glucosa). Realizado por duplicado.

VIII. CONCLUSIONES.

Lecanicillium y *Beauveria bassiana* cultivadas en medio líquido y superficial que contenían n-hexano, tolueno o la mezcla de ambos hidrocarburos, presentaron aglomerados de esporas así como micelio fino, escaso y ramificado. Estas determinaciones mostraron que las cepas estudiadas son capaces de crecer en medios con tolueno y/o n-hexano. Algunas cepas presentaron mayor inhibición en el desarrollo de las hifas (deformación) empleando n-hexano que con tolueno. *Lecanicillium* 157 cultivada con tolueno tuvo el mayor crecimiento radial y diámetro de hifas. Mientras que *Lecanicillium* EH-460 presentó la mayor producción de biomasa en medio líquido con n-hexano, *Lecanicillium* 2149 en mezcla de n-hexano/tolueno.

Las cepas de *Lecanicillium* EH-460, 157 y 2149 tienen capacidad de degradar entre un 41% a 57% de n-hexano o tolueno en medio líquido con o sin quitina coloidal. La máxima velocidad de degradación fue observada con *L. lecanii* 157 (9.1×10^{-3} g tolueno/m³•h) en medio mineral con tolueno y *L. lecanii* 2149 adicionando quitina coloidal (6.4×10^{-3} g tolueno/m³•h).

La utilización de n-hexano o tolueno como fuente de carbono induce las actividades enzimáticas de endoquitinasas (Endo) y N-acetil-hexosaminidasa (NHasa) en *Lecanicillium*. En medio mineral con quitina coloidal la adición de tolueno modificó la expresión de actividad quitinolítica de *Lecanicillium* 2149 reduciendo la expresión de NHasa hasta un 98% con respecto a la determinada en medio mineral con quitina. Empleando tolueno como única fuente de carbono *L. lecanii* 2149 realizó expresión de NHasa (0.27 mU/ml) y Endo (11 U/ml), teniendo actividades volumétricas de Endo semejantes al medio con quitina y tolueno. El rendimiento ($Y_{\text{Endo/x}}$) en este medio fue hasta cuatro veces más alto que en el medio con quitina coloidal (control). Confirmando que la presencia de estos hidrocarburos induce sistemas relacionados con la entomopatogenicidad del hongo como es la actividad quitinolítica, además de otros mecanismos que permitan el consumo de los oligómeros de quitina reduciendo la actividad de NHasa.

Considerando a las hidrofobinas como un mecanismo que los hongos emplean en su desarrollo en ambientes hidrofóbicos se observó la expresión de estas en *Lecanicillium*. Observando que *L. lecanii* 2149 al cultivarse en medio líquido formó micelio aéreo que fue capaz de adherirse a superficies hidrofóbicas como el cristal, característica se atribuye a la expresión de hidrofobinas como la SC3. En estudios preliminares para determinar la expresión de hidrofobinas se amplificó cebadores de la hidrofobina SC3 obteniendo productos de peso aproximado al fragmento del gen que se esperaba. Siendo necesario realizar más pruebas para comprobar la expresión hidrofobina.

Por lo tanto, *Lecanicillium* es capaz de crecer en medios hidrofóbicos además de degradar hidrocarburos (n-hexano o tolueno) como única fuente de carbono. Dentro de los mecanismos inducidos se expresan endoquitinasas y N-acetil-hexosaminidasa. Aún cuando no se ha confirmado plenamente la expresión de hidrofobinas, se observa un comportamiento en los resultados preliminares sugieren que la hidrofobina SC3 sí se expresa en la cepa *L. lecanii* 2149, lo cual es congruente con los resultados anteriores debido a que se correlaciona con el crecimiento en medios hidrofóbicos, que indica la expresión de estas. Indicando que se ha cumplido parte de la hipótesis propuesta.

IX. PERSPECTIVAS.

*Completar los estudios de expresión de las hidrofobinas, aumentando el número de experimentos, así como determinar la expresión de otras hidrofobinas

*Realizar estudios para determinar el efecto de sustratos hidrofóbicos (hidrocarburos) en la expresión de hidrofobinas de *Lecanicillium*, empleando cepas con capacidad degradadora de tolueno o n-hexano.

*Evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos (tolueno y/o n-hexano) de *Lecanicillium* sistemas de biofiltración empleando soportes inorgánicos (e.g. vermiculita, poliuretano, etc).

*Estudiar cepas *Lecanicillium* con capacidad degradadora de hidrocarburos (cepas aclimatadas) en medios de cultivo identificados como adecuados para la degradación de hidrocarburos.

X. TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES.

1. M.C. Marín-Cervantes, J. Sepúlveda, M. Plascencia, G.Viniegra-González* and K. Shirai. Effect of the type of mycelial aggregation of *Verticillium lecanii* on the production profiles of chitinases and proteases by solid-state fermentation on polyurethane foam. 12th International Biotechnology Symposium and Exhibition Santiago, Chile. 17 al 22 octubre 2004.
2. Marín MC, Viniegra G, Revah S, Damián-Matsumura P, Shirai K. “Cultivo de hongos entomopatógenos productores de quitinasas degradadores de hidrocarburos” III Simposio Iberoamericano de Quitina. Córdoba España. 27 al 29 de Septiembre 2004.
3. Curso de biopolímeros, Universidad de concepción, Concepción, Chile, 10 al 28 de enero.
4. Laura Ramírez-Coutiño, María del Carmen Marín-Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah and Keiko Shirai* Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of N-acetylglucosamine using *Lecanicillium fungicola* chitinases. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control, Guanajuato Gto. México, June 26-30 2005.
5. Laura Ramírez-Coutiño, María del Carmen Marín-Cervantes, Sergio Huerta, Sergio Revah, Keiko Shirai*. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry* **41**: 1106-1110.
6. K. Shirai, M. Del Carmen Marin, E. Soriano, M. Archundia, Miguel Magana, S. Revah. Evaluation of chitinolytic activities of *Lecanicillium* strains cultivated with addition of hydrocarbons as carbon source. 10th International Chitin and Chitosan, Montpellier, France. September 6 and 9 2006.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

- *Acuña, M. E., Pérez, F., Auria, R., Revah S., 1999. Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnology and Bioengineering*. **63**(2): 175-184
- *Alba J., Conde E. and Pérez G. F., 2003. Degradation of the main components of cellulose-paint thinner by the mould *Scopulariopsis brevicaulis* cultured on rice hulls. *Letters in Applied Microbiology*. **37**:7-11.
- *Askolin S., Nakari-Setälä T., Tenkanen M., 2001. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl. Microbiol Biotechnol*. **57**: 124-130.
- *Arriaga S., Revah S., 2005. Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnology and bioengineering*. **90**(1):107-115.
- *Bidochka, M. J. and Khachatourians, G. G., 1988. N-acetyl-D-glucosamine mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**(11): 2699-2704.
- *Boowden, C. G., Smalley, E., Guries, R.P., Hubbes, M., Temple, B., and Horgen, P.A., 1996. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. *Mol. Plant Microbe Interact*. **9**: 556-564
- *Calonje M., Bernardo D., Novaes-Ledieu M., and García M. C., 2002. Properties of a hydrophobin isolated from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol*. **48**: 1030-1034.
- *Coudron T. A., Kroha M. J. and Ignoffo C. M., 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Comp. Biochemistry. Physiology*. **79**(3):339-348

- *Crespo, R., M. P. Juárez and L.F.R. Cafferatta, 2000. Biochemistry of the interaction between entomopathogenous fungi and their insect host-like hydrocarbons. *Mycologia*. **92**: 528–536.
- *Crespo R., Juárez M. P., Dal Bello G. M., Padín S., Calderón G. and Pedrini N., 2002. Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *Biocontrol*. **47**:685-698.
- *Cundell AM, Mueller WC, Traxler RW., 1976. Morphology and ultrastructure of a *Penicillium* sp. grown on n-hexadecane or peptone. *Appl Environ Microbiol*. **31**:408–414.
- *Deshpande M. V., 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological Applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **45**:273-281.
- * Fenice M., Di Giambattista R., Petruccioli M., Federici F., 1997. Production of N-Acetyl-D-Glucosamine and Chitinolytic Enzymes by a Strain of *Verticillium lecanii* Cultivated in Bench-top Fermentor. *Advance in Chitin Science*. **2**:145-150.
- *Flach. J., Pilet P. E., and Jolles P., 1992. what's new in chitinase research?. *Experientia* **48**:701-716.
- *Francesc X. Prenafeta-Boldú, Richard Summerbell and G. Sybren de Hoog, 2005. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard?. Federation of European Microbiological Societies Published Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved. Rev XX. pp. 1-22.
- *Funtikova N. S., and Mysyakina I. S., 2003. Sporangiospores of the Fungus *Mucor lusitanicus* 12M:Correlation between Lipid Composition, Viability, and Morphology of Growth upon Germination. *Microbiology*. **72**(6): 686–689.

*García P. E. I., Hernandez S., Favela T. E., Auria R., Revah S., 2001. Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol Bioeng.* **76**(1):61-69.

*Gooday G. W., 1996. Aggressive and Defensive Roles for Chitinases. *Chitin Enzymology.* **2**:125-133.

*Iglesias Arroyo M., Paniagua Paniagua N., Larralde Corona C. P. and Shirai K., 2002. "Elicitors of fungal cell wall degrading enzymes production by *Verticillium fungicola* and its interaction with phytopathogenic fungi". VIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, VI Congreso Iberoamericano de Polímeros, II Simposio Iberoamericano de Quitina, XV Congreso Nacional de Polímeros. Acapulco, Guerrero México. 10-15 de Noviembre 2002.

*Krivobok S., Miriouchkine E., Seigle-Murandi F. and Benoit-Guyod J. L., 1998. Biodegradation of Anthracene by Soil Fungi. *Chemosphere.* **37**(3): 523-530.

*Linder M., Geza R., Szilvay R., Nakari-Setälä T., Söderlund H. and Penttilä M., 2002, Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei*. *Protein Science.* **11**: 2257-2266.

*Lorito, M. C., Peterbauer, C. K., Hayes, and G.E. Harman. 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiol.* **140**: 623-629.

*Marín M. C., Matsumoto Y., Viniegra G. and Shirai, K. 2006. Effect of the type of mycelial aggregation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases and proteases by solid-state fermentation on polyurethane foam. En preparación.

*Matsumoto Y., Saucedo G., Revah S., and Shirai K., 2001. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentation utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochem* **39**(6):665-671.

*Matsumoto Y., Saucedo G., Revah S., and Shirai K., 2004. Production of beta-N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochem.* **39**(6):665-6714.

*Nuero, O. M., 1995. Production of chitinase by *Fusarium* Species. *Current Microbiol.* **30**:287-289.

*Olmedo-Monfil V., Mendoza-Mendoza A., Gomez I., Cortes C, Herrera-Estrella A, 2002. Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *prb1* in *Trichoderma atroviride*. *Mol Genetics Genomics.* **267**(6): 703-712.

*Ortíz I., Revah S and Auria R., 2003. Effects of parking material on the biofiltration of benzene, toluene and xylene vapours. *Environ Technol.* **24**: 265-275.

* Papagianni Maria, 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances.* **22**: 189-259.

*Plascencia-Jatomea Maribel, Viniegra Gustavo, Olayo Roberto, Castillo-Ortega Mónica, Keiko Shirai, 2003. Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Biosci* **3**(10):582–586.

*Quijano-Govantes G, Ramírez-Coutiño L. Paniagua N, Larralde-Corona CP and Shirai K., 2004. Evaluation of pH of culture on the chitinolytic and proteolytic activities of *Verticillium fungicola* using shrimp waste silage. *Advances in Chitin Science*, volume VII. Boucher I, Jamieson K and Retnakaran A (eds.) Montreal. pp 222-225.

*Ramírez-Coutino L., Marín-Cervantes M. C., Huerta S., Revah S., Shirai K., 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochem.* **41**: 1106–1110.

*Revah M. S., and Carroad, P. A., 1981. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. *Biotechnol and Bioeng.* **23**:1067-1078.

* Richards W. C., Sticklen, M. B. and Sherald J. L.. 1993. Cerato-ulmin: a unique wilt toxin of instrumental significance in the development of Dutch elm disease. *Dutch Elm Disease Research, cellular and molecular approaches.* 89-151.

*Ronit Pakula and Amihay Freeman, 1996. A new continuous Biofilm Bioreactor for Immobilized Oil-Degrading Filamentous Fungi. *Biotechnol and Bioeng.* **49**: 20-25.

*Sahai A. S., and Manocha M. S., 1992. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Reviews.* **11**:317-338.

*Schuren, F. H. J. and Wessels, J.G.H., 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene.* **90**:199-205.

*Shirai, K., 2004. Informe final, Producción de quitinasas extracelulares de *Verticillium lecanii*, purificación y caracterización. Proyecto CONACYT 400200-5-I33566-E.

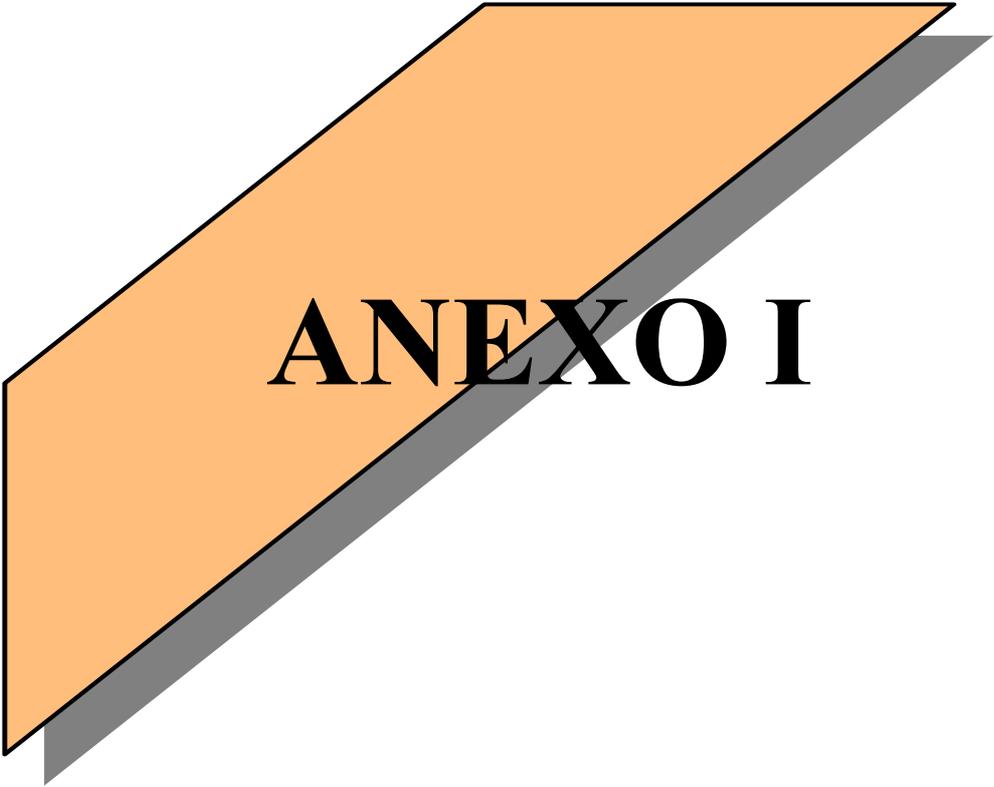
*St. Leger R. J., Joshi I., and Roberts D., 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied Environ Microbiol.* **64**(2): 709–713.

*Steenberg T., Hunber RA., 1999. Entomopathogenic potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteomycotina : Hyphomycetes). *J. Invertebr Pathol.* **73**(3): 309-314.

*Tortella G.R., Diez M.C., Duran N., 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Crit Rev Microbiol.* **31**(4):197-212.

- *Tronsmo A. and Harman G. E., 1993. Detection and quantification of N-acetyl β -D glucosaminidase, chitobioside, and endoqutinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry*. **208**:74-79.
- *Tronsmo A., Hjeljord L., Klemsdal S. S., Varum K. M., Nordtveit H. R. and Harman G. E., 1996. Chitinolytic enzymes from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* Chitin Enzymology. **2**:235-244.
- *van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM and Witholt B., 2003. Diversity of alkenes hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas and Technol*. **58**(4): 427-440.
- *van der Vegt, W., van der Mei, H.C., Wösten, H.A.B., Wessels, J. G. H., and Busscher, H. J. 1996. A comparison of the surface activity of the fungal hydrophobin SC3p with those of other proteins. *Biophys. Chem*. **57**: 253-260
- *Vázquez-Garcidueñas, S., C. Leal-Morales and A. Herrera-Estrella., 1998. Analysis of the b-1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environ Microbiol*. **64**(4):1442-1446.
- *Vroumsia T., Steiman R., Seigle-Murandi F., Benoit-Guyod J. L., 1999. Effects of culture parameters on the degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP) by selected Fungi. *Chemosphere*. **39**(9): 1397-1405.
- *Walker, J. D. and Cooney J. J., 1973. Pathway of n-Alkane Oxidation in *Cladosporium resinae*. *J Bacteriol*. Aug., pp. 635-639.
- *Wessels, J. G. H., de Vries, O.M.H., Ásgeirsdóttir, S.A. and Schuren, F.H.J., 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum commune*. *Plant Cell*. **3**: 793-799.
- *Wessels, J. G. H., 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Ann. Rev. Phytopathol*. **32**: 413-437.

- *Wessels, J. G. H., 1997. Hydrophobins: proteins that change the nature of a fungal surface. *Adv. Microb. Phys.* **38**: 1-45.
- *Wösten, H.A.B., de Vries, O.M.H. and Wessels, J. G. H., 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell.* **5**: 1567-1574.
- *Wösten, H.A.B., Ásgeirsdóttir, S. A., Krook, J. H., Drenth, J.H.H. and Wessels, J.G.H., 1994. The SC3p hydrophobin self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *Eur. J. Cell Biol.* **63**: 122-129.
- *Wösten, H.A.B. and Wessels, J. G. H., 1997. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience* **38**: 363-374.
- *Wösten HAB y Willey J., 2000. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology.* **146**: 767–773
- *Woertz JR, Kinney K A, McIntosh NDP, Szanislo P. J., 2001. Removal of toluene in a vapour-phase bioreactor containing a strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. *Biotechnol Bioeng.* **75**: 550-558.
- *Yedidia I., Benhamou N., and Chet I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma Harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology.* 1061-1071.
- *Zangi Ronen, Marcel L. de Vocht, George T. Robillard, and Alan E. Mark, 2002, Molecular Dynamics Study of the Folding of Hydrophobin SC3 at a Hydrophilic/Hydrophobic Interface. *Biophysical Journal.* **83**(7) 112–124.
- *Zhu, J. P Y., Smits, W. K. and Bol J., 1994. Nutrition and Food Research. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters.* **16**(6):643-648.



ANEXO I

AI.1. Curva patrón de cuantificación de proteína

La curva estándar para la determinación de proteína, se realizó con la solución estándar de seroalbúmina bovina (0.1 mg/ml).

Siguiendo el orden que se marca en la Tabla A.1 se fue depositando la cantidad correspondiente de solución estándar y H₂O en cada tubo de ensaye:

Tabla A.1 Preparación de la muestra a analizar para la curva patrón de proteína con seroalbúmina como bovina como estándar mediante la técnica de Bio Rad (Bradford, 1976)

Tubo	Solución estándar (ml)	H₂O (ml)
1	0	1
2	0.1	0.9
3	0.2	0.8
4	0.3	0.7
5	0.4	0.6
6	0.5	0.5
7	0.6	0.4
8	0.7	0.3
9	0.8	0.2
10	0.9	0.1
11	1.0	0

Después se agregaron 3 ml de H₂O a todos los tubos (dilución final de 1:4), se agitaron y tomaron 0.8 ml de cada solución colocándolos en un nuevo tubo manteniendo el orden marcado, a estos tubos se agregó 0.2 ml de reactivo de Bradford, después de agitar suavemente, se esperó 5 minutos y se midieron en el espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra) a 595 nm, obteniendo los datos que se presentan en la figura A.1, con los se calculó la ecuación de la línea que se empleó en la determinación de proteína.

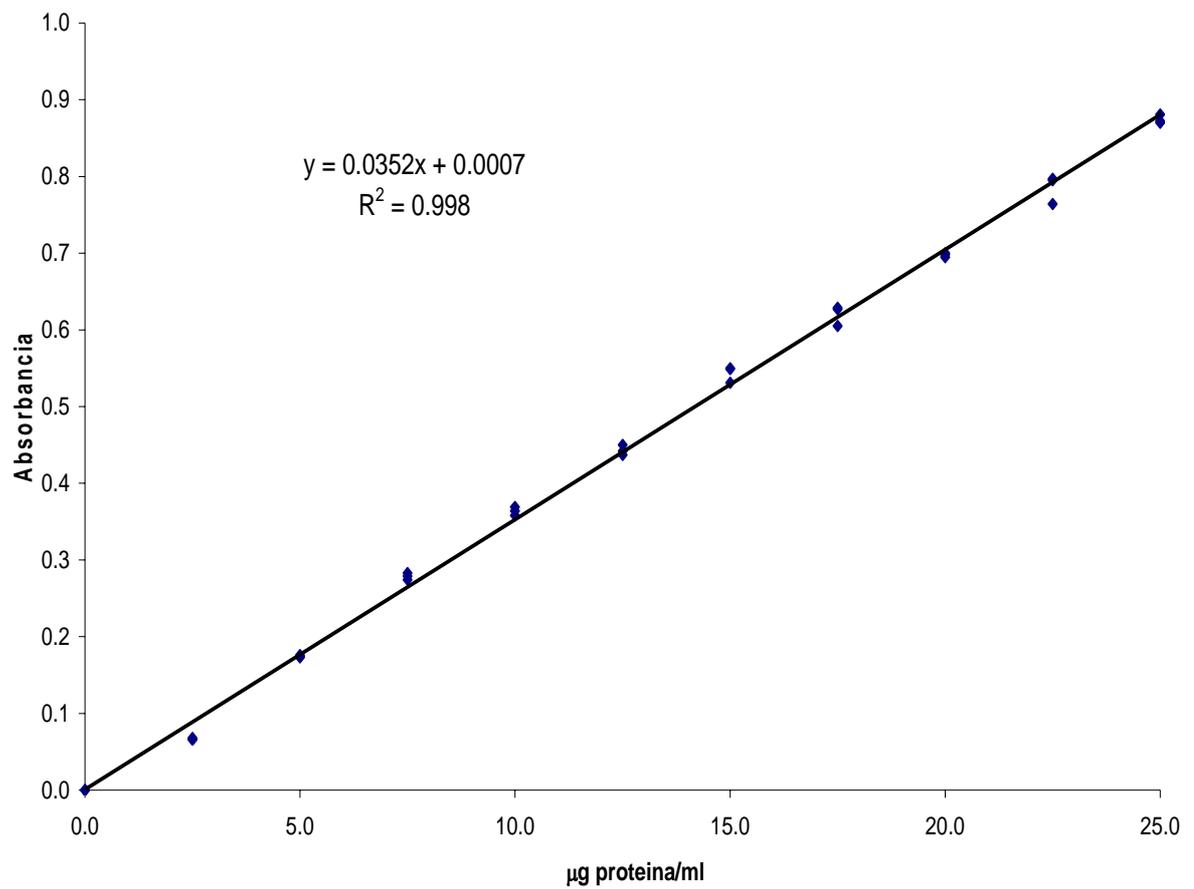


Figura A.1. Curva padrão de proteína utilizando soroalbúmina bovina como estándar mediante la técnica de Bio Rad (Bradford, 1976)

AI.2. Curva de p-nitrofenol utilizada en la determinación de actividad de N-acetil-hexosaminidasa.

Para la curva de p-nitrofenol se utilizó la solución estándar de p-nitrofenol (0.1 mg/ml), siguiendo las concentraciones y el orden indicado en la tabla A.2 fueron preparadas las soluciones en cada tubo:

Tabla A.2 Preparación de la curva p-nitrofenol como estándar para determinar la actividad de N-acetil-hexosaminidasa

Tubo	Solución estándar (ml)	H₂O (ml)	Amortiguador Citrato-fosfato (ml)*	NaOH (μl)
1	0.00	0.40	0.20	1.0
2	0.02	0.38	0.20	1.0
3	0.04	0.36	0.20	1.0
4	0.06	0.34	0.20	1.0
5	0.08	0.32	0.20	1.0
6	0.10	0.30	0.20	1.0

*amortiguador de citratos fosfatos 0.2 M pH 5.6,

Después de la adición de los reactivos, los tubos fueron agitados ligeramente y las muestras analizadas en un espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra) a 400 nm de absorbancia, obteniendo las lecturas que se presentan en la figura A.2, con los que se obtuvo la ecuación lineal que se utilizó para calcular de la concentración de p-nitrofenol presente para la determinación de actividad enzimática de N-acetil hexosaminidas.

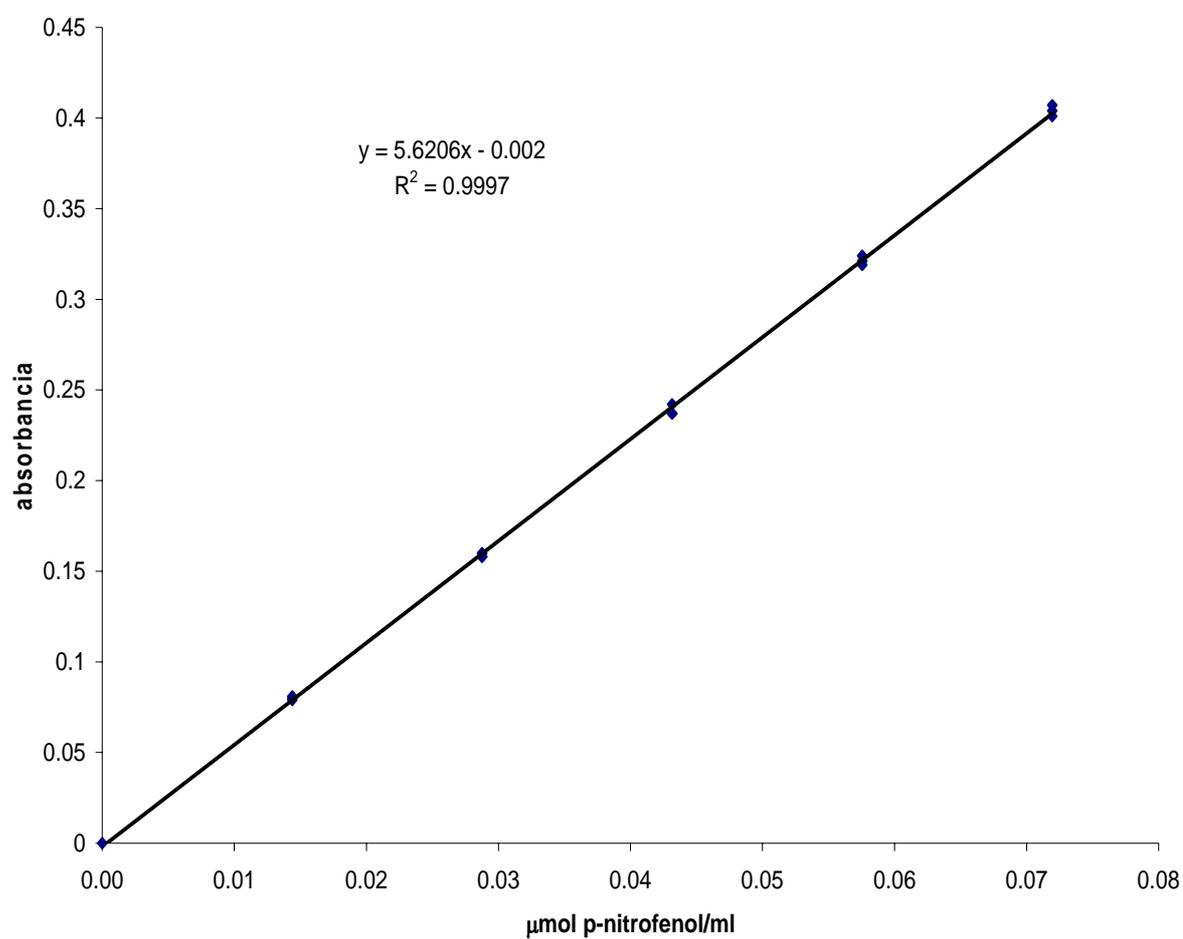


Figura A.2 Curva patrón de p-nitrofenol para la determinación de actividad de N-acetil-hexosaminidasa.

AI.3. Curva patrón de glucosa determinada con la técnica de azúcares reductores (DNS).

Para la curva patrón se utilizó la solución estándar de N-acetil glucosamina (1mg/ml) siguiendo el desarrollo que se presenta en la tabla A.3:

Tabla A.3 Preparación de la curva patrón de azúcares reductores.

Tubos	Solución estándar (ml)	H₂O (ml)	Reactivo de DNS (ml)
1	0.0	1.0	1
2	0.1	0.9	1
3	0.2	0.8	1
4	0.3	0.7	1
5	0.4	0.6	1
6	0.5	0.5	1
7	0.6	0.4	1
8	0.7	0.3	1
9	0.8	0.2	1
10	0.9	0.1	1
11	1.0	0.0	1

Una vez adicionadas las soluciones, los tubos fueron colocados a baño maría por 5 minutos, parando la reacción con hielo, ya fríos se adicionó 8 ml de H₂O, luego se agitaron vigorosamente y se procedo a leer las muestras en el espectrofotómetro (Jenway 6305, Inglaterra) a una absorbancia de 475 nm, obteniendo los datos que se presentan en la figura A.3, con los que se realizando el cálculo de la ecuación lineal que se muestra, empleada en la determinación de azúcares reductores presentes.

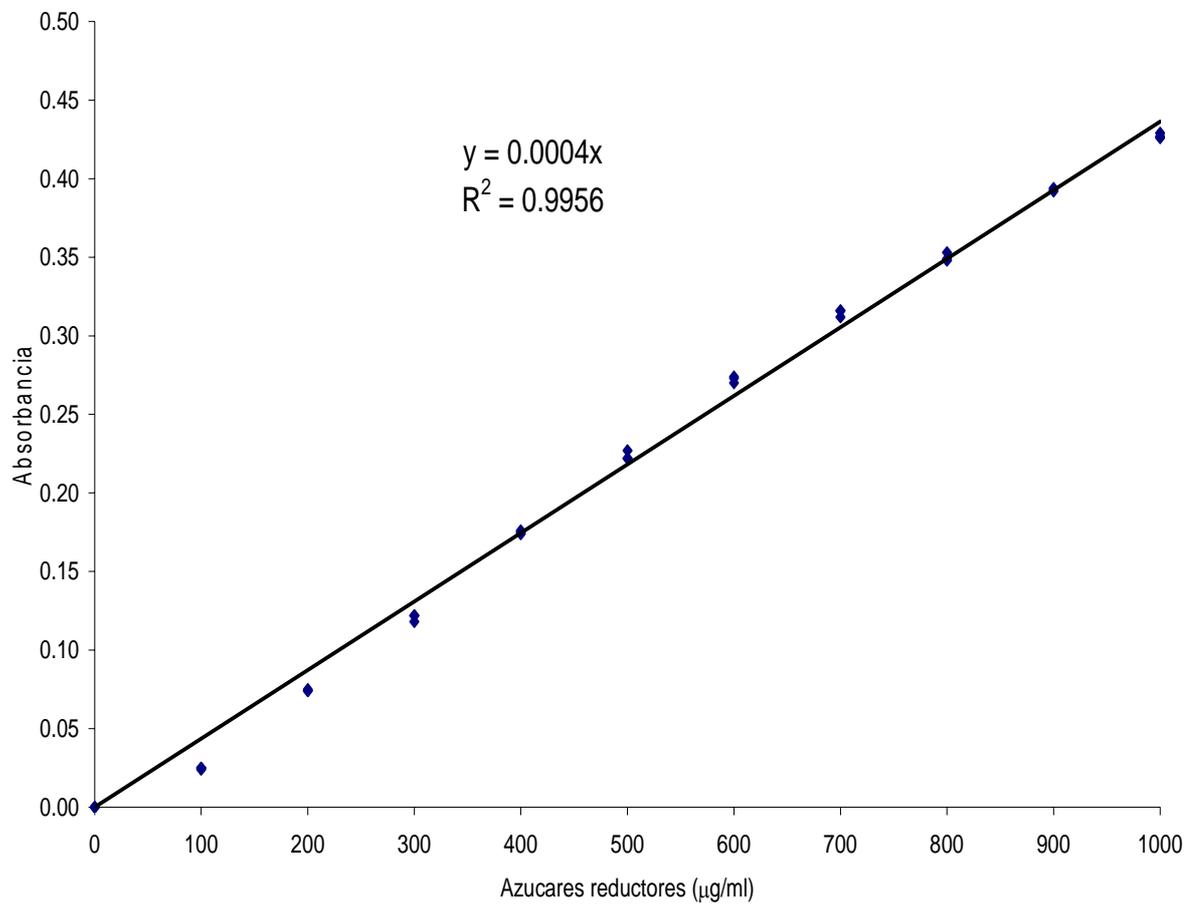
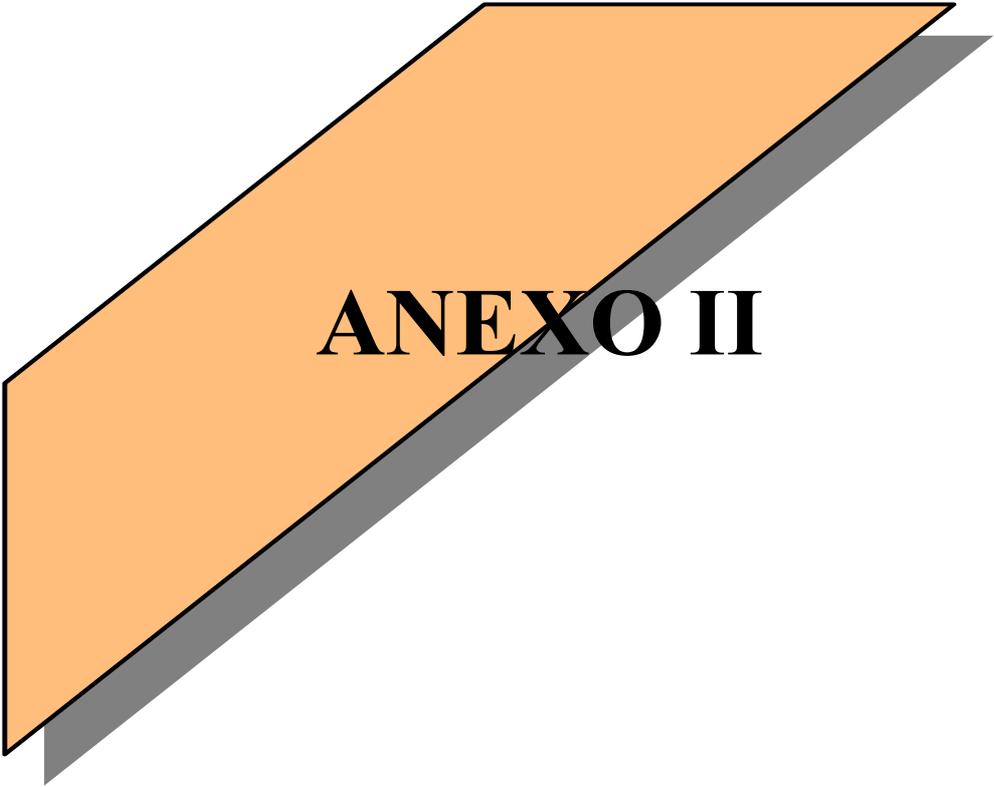


Figura A.3. Curva patrón para determinación de azucares reductores (DNS)



ANEXO II

AII.1. Quitina coloidal.

La quitina coloidal fue preparada mediante una modificación del método de Pegg (1998). La pasta obtenida fue neutralizada por lavados con agua destilada y conservada en refrigeración (2 °C) con 0.02% (p/v) de azida de sodio hasta su posterior utilización.

AII.2. Preparación de suspensión de quitina coloidal para determinación de endoquitinasas.

Se preparó una suspensión al 1% (p/v) de quitina coloidal (con 97 % de humedad) y un amortiguador de fosfatos 50mM a pH 6.7 con 0.01M de azida de sodio (Tronsmo *et al.*, 1992).

AII.3. Preparación del reactivo de DNS

Se disolvieron 2.5 g de ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), 2.5 g de NaOH, 0.125 g de sulfito de anhídrido y 0.5 g de fenol en aproximadamente 100 ml de agua y se aforaron a 250 ml.

AII.4. Preparación del gel de agarosa al 1% para ARN.

En un matraz Erlenmeyer se adicionaron 35 ml de agua bidestilada con DEPC (estéril) y 0.5g de agarosa, se calentó a ebullición, después de dejar enfriar (aproximadamente a 40°C), se agregaron 5 ml de solución MOPS 10x y 10 ml de formaldehído al 37%, mezclado perfectamente, se vació en la cámara de preparación del gel (previamente limpia y preparada con sus aditamentos: peine y extremos), una vez solidificado se colocó en la cámara de electroforesis, cubriéndose con solución MOPS 1X.

AII.5. Preparación del gel de agarosa al 0.8% o 1.2% para ADN.

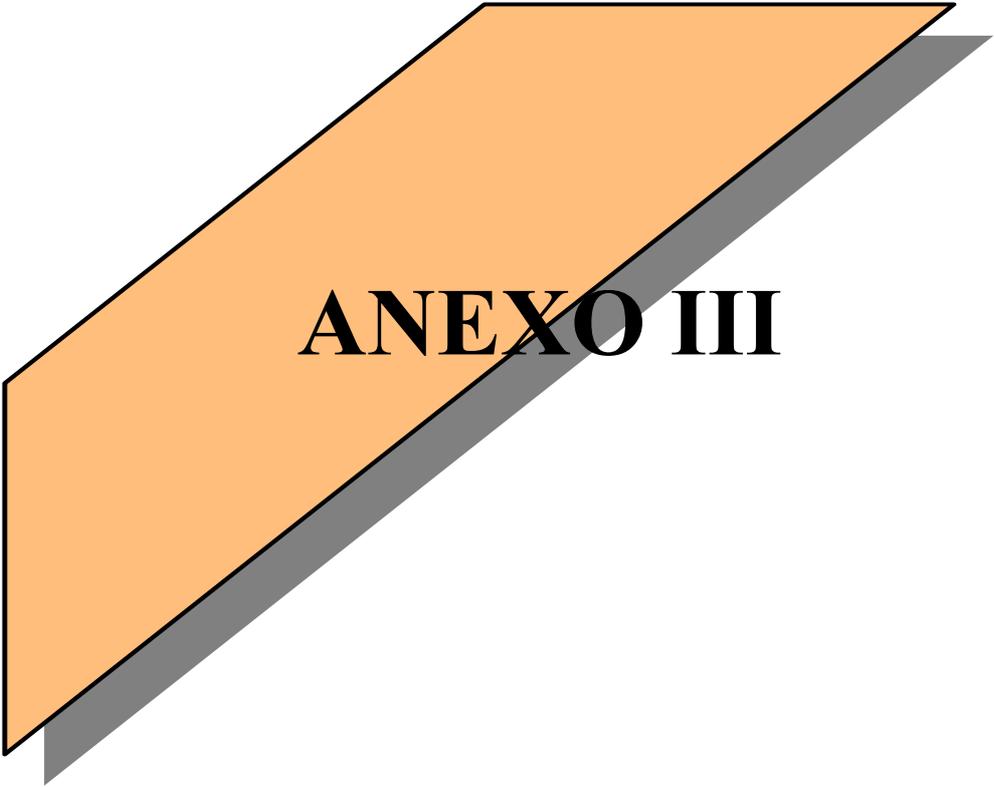
Se depositó 25 ml de TBE 0.5X nuevo (amortiguador de Tris, borato y EDTA) y agarosa de acuerdo al % (0.2 g para el gel al 0.8% o 0.3 g para el gel al 1.2%) en un matraz Erlenmeyer estéril, que fue calentado ha ebullición, una vez tibio se deposito su contenido en la cámara de preparación del gel (previamente limpia y preparada con sus aditamentos: peine y extremos), una vez frío el gel se retiraron los aditamentos y fue colocado en la cámara de electroforesis, llenando esta con Buffer TBE 0.5X hasta cubrir el gel.

AII.6 Diseño de oligo nucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para amplificar regiones de los genes de ciclofilina e hidrofobina SC3 de *Schizophyllum commune* fueron diseñados a partir de secuencias obtenidas del GenBank (NCBI) y diseño de oligos con el programa Primer3 Output (Tabla AII.1)

Tabla AII.1. Oligonucleótidos empleados para en la identificación del gen de ciclofilina e hidrofobinas en *L. lecanii* 2149.

Gen	Secuencia	Producto de PCR (pB)	No. de acceso
Ciclofilina	5' GACATCACGGCTGGCGA 3' 5' TCTTGCTGGTCTTGCCATT 3'	457	NM172243
Hidrofobina SC3	5' GAGGACAATGCCGAGCAG 3' 5' TCGTGTTCTCTACGCCTTC 3'	412	M32329



ANEXO III

Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en medio sumergido.

Tabla AIII.1 Análisis de varianza para la selección de cepas con mejor crecimiento en medio líquido con hidrocarburos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (Alpha=0.05)
A: Cepa	21	2.380671	26.21	0.000000*	1
B: Medio de cultivo	2	92.36773	1016.84	0.000000*	1
AB	42	1.489302	16.4	0.000000*	1
Total	4751				

Tabla AIII.2 Comparación de medias de diámetros de hifas de medios de cultivo líquido con diferente fuente de carbono.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (mm)	Grupos diferentes
MHT	1,100	0.9943284	MHTel, MGel
MHTel	1,478	1.306343	MHT, MGel
MGel	2,173	1.607882	MHT, MHTel

Alpha=0.050 Error Term=S DF=4685 MSE=9.083823E-02 Critical

Value=3.314497

MHT – Medio mineral con mezcla de n-hexano/tolueno, MHTel – Medio mineral con mezcla de n-hexano/tolueno y extracto de levadura, MGel – Medio mineral con glucosa y extracto de levadura

Tabla AIII.3 Comparación múltiple de medias de diámetros de hifas de *Lecanicillium* en medio líquido con la mezcla de hidrocarburos.

Cepa	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
5129	0.4609	EH-458, 2149, 991, 2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
EH-348	0.6529	2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029.
EH-459	0.6565	2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
4519	0.7058	2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
EH-458	0.7552	5129, 2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
974	0.7730	2218, 2009, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
2149	0.7891	5129, 2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
991	0.8153	5129, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029

2218	1.0195	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
2009	1.0313	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
ATCC26854	1.0332	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 2149, 2858, EH-460, EH-457, 1029
3909	1.0395	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2832, 2858, EH-460, EH-457, 1029
2460	1.0887	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2858, EH-460, EH-457, 1029
2916	1.1097	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2858, EH-460, EH-457, 1029
157	1.1135	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, EH-460, EH-457, 1029
ATCC46578	1.1244	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2858, EH-460, EH-457, 1029
5153	1.1339	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2858, EH-460, EH-457, 1029
2832	1.2479	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2218, 2009, 3909, EH-457
2858	1.3055	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, ATCC46578, 5153
EH-460	1.3601	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153
EH-457	1.4176	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153, 2832
1029	1.4666	5129, EH-348, EH-459, 4519, EH-458, 974, 2149, 991, 2218, 2009, ATCC26854, 3909, 2460, 2916, 157, ATCC46578, 5153

Alpha=0.050 Error Term=S DF=1087 MSE=4.951371E-02 Critical Value=5.113306

Tabla AIII.4 Comparación múltiple de medias de diámetros de hifas de *Lecanicillium* en medio líquido con la mezcla de hidrocarburos y extracto de levadura.

Cepas	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
991	0.8928	2460, ATCC26854, ATCC46578, 2832, 5129, EH-460, 2218, 2009, EH-348, 157, EH-459, EH-458, EH-457, 4519, 2858, 3909, 1029.
2149	0.9861	2460, ATCC26854, ATCC46578, 2832, 5129, EH-460, 2218, 2009, EH-348, 157, EH-459, EH-458, EH-457, 4519, 2858, 3909, 1029
5153	1.0531	ATCC46578, 2832, 5129, EH-460, 2218, 2009, EH-348, 157, EH-459, EH-458, EH-457, 4519, 2858, 3909, 1029.
2916	1.1394	EH-348, EH-459, EH-458, EH-457, 4519, 2858, 3909, 1029
2460	1.1820	991, 2149, EH-348, 157, EH-459, EH-458, EH-457, 4519, 2858, 3909, 1029.
ATCC26854	1.1976	991, 2149, EH-348, EH-459, EH-458, EH-457, 4519, 2858, 3909, 1029
ATCC46578	1.2472	991, 2149, 5153, EH-459, EH-458, EH-457, 4519, 2858, 3909, 1029.
2832	1.3019	991, 2149, 5153, EH-458, EH-457, 4519, 3909, 1029
5129	1.3076	991, 2149, 5153, 1029

EH-460	1.3229	991, 2149, 5153, EH-458, 4519, 3909, 1029
2218	1.3383	991, 2149, 5153, 3909, 1029
2009	1.3414	991, 2149, 5153, 1029
EH-348	1.4079	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854
157	1.4236	991, 2149, 5153, 2460
EH-459	1.4560	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854, ATCC46578
EH-458	1.4782	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854, ATCC46578, 2832, EH-460
EH-457	1.4873	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854, ATCC46578, 2832
4519	1.4886	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854, ATCC46578, 2832, EH-460
2858	1.4975	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854, ATCC46578
3909	1.5341	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854, ATCC46578, 2832, EH-460, 2218
1029	1.5956	991, 2149, 5153, 2916, 2460, ATCC26854, ATCC46578, 2832, 5129, EH-460, 2218, 2009

Alpha=0.050 Error Term=S DF=1448 MSE=9.232858E-02

Tabla AIII.5 Comparación múltiple de medias de diámetros de hifas de *Lecanicillium* en medio líquido con diferente fuente de carbono

Tratamiento	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
2832 MHT	1.2479	EH-457 MHTel, 4519 MHTel, 2858 MHTel, 3909 MHTel, 1029 MHTel, EH-460 MHTel, 2009 MGel, 3909 MGel, ATCC46578 MGel
2858 MHT	1.3055	1029 MHTel, EH-460 MGel, 2009 MGel, 3909 MGel, ATCC46578 MGel
EH-460 MHT	1.3601	1029 MHTel, EH-460 MGel, 2009 MGel, 3909 MGel, ATCC46578 MGel
EH-457 MHT	1.4175	EH-460 MGel, 2009 MGel, 3909 MGel, ATCC46578 MGel
1029 MHT	1.4666	ATCC46578 MGel
EH-457 MHTel	1.4873	2832 MHT, EH-460 - MGel, 2009 - MGel, 3909 - MGel, ATCC46578 - MGel
4519 MHTel	1.4886	2832 - MHT, EH-460 MGel, 2009 MGel, 3909 MGel, ATCC46578 MGel
2858 MHTel	1.4975	2832 MHT, EH-460 MGel, 2009 MGel, 3909 MGel, ATCC46578 MGel
3909 MHTel	1.5341	2832 MHT, EH-460 MGel, 2009 MGel, 3909 MGel, ATCC46578 MGel
1029 MHTel	1.5956	2832 MHT, 2858 MHT, EH-460 MHT, ATCC46578 MGel
EH-460 MGel	1.7512	2832 MHT, 2858 MHT, EH-460 MHT, EH-457 MHT, EH-457 MHTel, 4519 MHTel, 2858 MHTel, 3909 MHTel

2009 MGel	1.7690	2832 MHT, 2858 MHT, EH-460 MHT, EH-457 MHT, EH-457 MHTel, 4519 MHTel, 2858 MHTel, 3909 MHTel
3909 MGel	1.7777	2832 MHT, 2858 MHT, EH-460 MHT, EH-457 MHT, EH-457 MHTel, 4519 MHTel, 2858 MHTel, 3909 MHTel
ATCC46578 MGel	1.8866	2832 - MHT, 2858 - MHT, EH-460 - MHT, EH-457 - MHT, 1029 - MHT, EH-457- MHTel, 4519- MHTel, 2858- MHTel, 3909- MHTel 1029- MHTel

Alpha=0.050 Error Term=S DF=913 MSE=0.1128548 Critical Value=4.742746

MHT – Medio mineral con mezcla de n-hexano/tolueno, MHTel – Medio mineral con mezcla de n-hexano/tolueno y extracto de levadura, MGel – Medio mineral con glucosa y extracto de levadura

Selección de cepas degradadoras de hidrocarburos en medio superficial.

Tabla AIII.6 Comparación múltiple de medias de crecimiento radial en medio mineral e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (mm)	Grupos diferentes
n-hexano	138	2.57	Tolueno
Tolueno	138	4.24	n-hexano

Alpha=0.050 Error Term=S DF=230 MSE=0.5764493 Critical Value=2.771807

Tabla AIII.7 Comparación múltiple de medias de crecimiento radial en medio mineral e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (mm)	Grupos diferentes
Bb MH	6	2	2460 MH, EH-460 MH, EH-357 MH, 991 MH, 3909 MT, 2858 MT, 5129 MT, 2916 MT, 157 MT
2460 MH	6	3.25	Bb MH, 991 MH, 3909 MT, 2858 MT, 5129 MT, 2916 MT, 157 MT
EH-460 MH	6	3.83	Bb MH, 3909 MT, 2858 MT, 5129 MT, 2916 MT, 157 MT
EH-357 MH	6	3.83	Bb MH, 3909 MT, 2858 MT, 5129 MT, 2916 MT, 157 MT
991 MH	6	4.58	Bb MH, 2460 MH, 5129 MT, 2916 MT, 157 MT
3909 MT	6	5.08	Bb MH, 2460 MH, EH-460 MH, EH-357 MH, 2916 MT, 157 MT
2858 MT	6	5.08	Bb MH, 2460 MH, EH-460 MH, EH-357 MH, 2916 MT, 157 MT
5129 MT	6	5.41	Bb MH, 2460 MH, EH-460 MH, EH-357 MH, 991 MH
2916 MT	6	6	Bb MH, 2460 MH, EH-460 MH, EH-357 MH, 991 MH, 3909 MT, 2858 MT

157 MT	6	6	Bb MH, 2460 MH, EH-460 MH, EH-357 MH, 991 MH, 3909 MT, 2858 MT
--------	---	---	--

Alpha=0.050 Error Term=S DF=50 MSE=0.1675 Critical Value=4.681458

MH – Medio mineral con n-hexano, MT – Medio mineral con tolueno, MM – Medio mineral con mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.8 Comparación múltiple de medias de biomasa en medio mineral e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Biomasa (g/caja)	Grupos diferentes
MH	46	1.15E-02	
MM	46	0.0158	
MT	46	1.88E-02	

Alpha=0.050 Error Term=S DF=69 MSE=2.137769E-04 Critical Value=3.387496

MH – Medio mineral con n-hexano, MT – Medio mineral con tolueno, MM – Medio mineral con mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.9 Comparación múltiple de medias de producción de biomasa en medio superficial e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Lecturas	Biomasa (g/caja)	Grupos diferentes
991 MM	2	0.0039	2149 MM, 4519 MH, EH-348 MH, 974 MH, 2149 MH, 991 MH, 2149 MT, 1029 MT, 2832 MT, 3909 MT, EH-458 MT
2858 MM	2	0.0044	4519 MH, EH-348 MH, 974 MH, 2149 MH, 991 MH, 2149 MT, 1029 MT, 2832 MT, 3909 MT, EH-458 MT
2149 MM	2	0.01	991 MM, EH-458 MT
4519 MH	2	0.0133	991 MM, 2858 MM
EH-348 MH	2	0.0135	991 MM, 2858 MM
974 MH	2	0.0148	991 MM, 2858 MM
2149 MH	2	0.0148	991 MM, 2858 MM
991 MH	2	0.0152	991 MM, 2858 MM
2149 MT	2	0.01535	991 MM, 2858 MM
1029 MT	2	0.01575	991 MM, 2858 MM
2832 MT	2	0.0174	991 MM, 2858 MM
3909 MT	2	0.0178	991 MM, 2858 MM
EH-458 MT	2	0.01945	991 MM, 2858 MM, 2149 MM

Alpha=0.050 Error Term=S DF=13 MSE=2.923077E-06 Critical Value=5.625381

MH – Medio mineral con n-hexano, MT – Medio mineral con tolueno, MM – Medio mineral con mezcla de n-hexanos y tolueno.

Tabla AIII.10 Comparación múltiple de medias de diámetro de hifas en medio mineral e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
n-hexano	2457	0.7409031	Mezcla, Tolueno
Mezcla	493	0.8243478	n-hexano, Tolueno
Tolueno	5079	0.976006	n-hexano, Mezcla

Alpha=0.050 Error Term=S DF=8026 MSE=1.932219E-02 Critical Value=3.314497

Mezcla: n-hexano/tolueno.

Tabla AIII.11 Comparación múltiple de medias de diámetro de hifas en medio superficial e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
1029 MH	0.7382	ATCC46578 MM, EH-457 MM, Bb MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, 2009 MM, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH.
EH-459 MH	0.7386	ATCC46578 MM, EH-457 MM, Bb MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, 2009 MM, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH.
2149 MH	0.7501	ATCC46578 MM, EH-457 MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, 2009 MM, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH.
2460 MH	0.7860	ATCC46578 MM, EH-457 MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, 2009 MM, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH.
ATCC46578 MM	0.8848	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, 1029 MT, 2009 MM, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH
EH-457 MM	0.9162	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, 1029 MT, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH
Bb MM	0.9179	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH
3909 MM	0.9342	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH
2858 MH	0.9363	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH
2149 MM	0.9385	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH
1029 MT	1.0124	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-457 MM, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT, EH-460 MH
2009 MM	1.0165	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-460 MH
975 MT	1.0458	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-457 MM, 3909 MM, 2858 MH, EH-460 MH
2218 MT	1.0563	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-457 MM, 3909 MM, 2858 MH, EH-460 MH
157 MT	1.0776	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-457 MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, EH-460 MH
2149 MT	1.0887	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-457 MM, Bb MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, EH-460 MH

ATCC26854 MT	1.0891	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-457 MM, Bb MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, EH-460 MH
EH-460 MH	1.1493	1029 MH, EH-459 MH, 2149 MH, 2460 MH, ATCC46578 MM, EH-457 MM, Bb MM, 3909 MM, 2858 MH, 2149 MM, 1029 MT, 2009 MM, 975 MT, 2218 MT, 157 MT, 2149 MT, ATCC26854 MT

Alpha=0.050 Error Term=S DF=1676 MSE=1.643834E-02 Critical Value=4.933754

MH – Medio mineral con n-hexano, MT – Medio mineral con tolueno, MM – Medio mineral con mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.12 Comparación múltiple de medias de crecimiento radial en medio mineral con quitina coloidal e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (mm)	Grupos diferentes
MQH	138	2.70	MQT
MQT	138	4.39	MQH

Alpha=0.050 Error Term=S DF=230 MSE=0.767971 Critical Value=2.771807

MQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno.

Tabla AIII.13 Comparación múltiple de medias de crecimiento radial en medio mineral con quitina e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (mm)	Grupos diferentes
EH-358 MQH	6	3.54	5129 MQT
157 MQH	6	3.75	5129 MQT
5129 MQH	6	4.17	5129 MQT
991 MQH	6	4.17	5129 MQT
EH-460 MQH	6	4.75	5129 MQT
4519 MQT	6	5.33	5129 MQT
ATCC26854 MQT	6	5.50	5129 MQT
EH-348 MQT	6	5.50	5129 MQT
3909 MQT	6	5.58	5129 MQT
5129 MQT	6	8.33	157 MQH, EH-358 MQH, 5129 MQH, 991 MQH, EH-460 MQH, 4519 MQT, ATCC26854 MQT, EH-348 MQT, 3909 MQT

Alpha=0.050 Error Term=S DF=50 MSE=1.406 Critical Value=4.681458

MQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno.

Tabla AIII.14 Comparación múltiple de medias de biomasa en medio mineral con quitina e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Biomasa (g/caja)	Grupos diferentes
MQT	46	1.20E-02	
MQH	46	1.49E-02	
MQM	46	1.64E-02	

Alpha=0.050 Error Term=S DF=69 MSE=3.729146E-03 Critical Value=3.387496

MQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno, MQM – Medio mineral con quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.15 Comparación múltiple de medias de biomasa en medio mineral con quitina e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Lecturas	Biomasa (g/caja)	Grupos diferentes
2832 MQM	2	0.0086	2149 MQM
EH-457 MQT	2	0.0105	2149 MQM
5129 MQM	2	0.0110	2149 MQM
4519 MQT	2	0.0115	2149 MQM
3909 MQM	2	0.0122	2149 MQM
ATCC4657 MQM	2	0.0135	2149 MQM
EH-458 MQH	2	0.0148	2149 MQM
2916 MQT	2	0.0155	2149 MQM
2832 MQH	2	0.0176	2149 MQM
157 MQH	2	0.01815	2149 MQM
5153 MQT	2	0.0233	2149 MQM
Bb MQH	2	0.0255	2149 MQM
974 MQT	2	0.0274	
974 MQH	2	0.0302	
2149 MQM	2	0.0622	2832 MQM, EH-457 MQT, 5129 MQM, 4519 MQT, 3909 MQM, ATCC4657 MQM, EH-458 MQH, 2916 MQT, 2832 MQH, 157 MQH, 5153 MQT, Bb MQH

Alpha=0.050 Error Term=S DF=15 MSE=7.955937E-05 Critical Value=5.649329

MQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno, MQM – Medio mineral con quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.16 Comparación múltiple de medias de diámetro de hifas en medio mineral con quitina coloidal e hidrocarburos.

Tratamiento	Diámetro (µm)	Grupos diferentes	Tratamiento
MQH	2069	0.7724	MQM, MQT

MQM	558	0.8246	MQH, MQT
MQT	3910	1.0091	MQH, MQM

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=6534 MSE=2.512038E-02 Critical Value=3.314497

MQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno, MQM – Medio mineral con quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.17 Comparación múltiple de medias de diámetro de hifas en medio mineral con quitina e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
5129 MQH	0.7988	ATCC46578 MQM, 975 MQM, 2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
4519 MQH	0.8132	2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
EH-459 MQH	0.8134	ATCC46578 MQM, 975 MQM, 2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
ATCC26854 MQM	0.8294	2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
2832 MQM	0.8385	2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
2832 MQH	0.8437	2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
2149 MQM	0.8906	2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
ATCC46578 MQM	0.9202	5129 MQH, EH-459 MQH, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
975 MQM	0.9323	5129 MQH, EH-459 MQH, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
2009 MQM	0.9621	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
2009 MQT	1.0441	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975 MQM, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
975 MQT	1.0501	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975 MQM, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
2149 MQT	1.0765	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975

		MQM, 2009 MQM, ATCC26854 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
1029 MQT	1.0965	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975 MQM, 2009 MQM, 2009 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
ATCC46578 MQT	1.1077	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975 MQM, 2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
ATCC26854 MQT	1.1275	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975 MQM, 2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 2460 MQH, EH-460 MQH
2460 MQH	1.3878	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975 MQM, 2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT
EH-460 MQH	1.4151	5129 MQH, 4519 MQH, EH-459 MQH, ATCC26854 MQM, 2832 MQM, 2832 MQH, 2149 MQM, ATCC46578 MQM, 975 MQM, 2009 MQM, 2009 MQT, 975 MQT, 2149 MQT, 1029 MQT, ATCC46578 MQT, ATCC26854 MQT

Alpha=0.050 Error Term=S DF=1746 MSE=1.886374E-02 Critical Value=4.933754

MQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno, MQM – Medio mineral con quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.18 Comparación múltiple de medias de crecimiento radial en medio mineral con glucosa y quitina coloidal e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (mm)	Grupos diferentes
Tolueno	138	10.08	n-hexano
n-hexano	138	32.93	Tolueno

Alpha=0.050 Error Term=S DF=230 MSE=5.694928 Critical Value=2.771807

Tabla AIII.19 Comparación múltiple de medias de crecimiento radial medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (mm)	Grupos diferentes
EH-359 MGQT	6	13.17	EH-358 MGQT, EH-348 H, EH-460 MGQH, 2460 MGQH, EH-358 MGQH, 2149 MGQH
3909 MGQT	6	14	EH-348 MGQH, EH-460 MGQH, 2460 MGQH, EH-358 MGQH, 2149 MGQH
5153 MGQT	6	14.33	EH-348 MGQH, EH-460 MGQH, 2460 MGQH, EH-358 MGQH, 2149 MGQH
991 MGQT	6	16.25	EH-348 MGQH, EH-460 MGQH, 2460 MGQH, EH-358

			MGQH, 2149 MGQH
EH-358 MGQT	6	18.33	EH-359 MGQT, EH-348 MGQH, EH-460 MGQH, 2460 MGQH, EH-358 MGQH, 2149 MGQH
EH-348 MGQH	6	35.33	EH-359 MGQT, 3909 MGQT, 5153 MGQT, 991 MGQT, EH-358 MGQT, 2149 MGQH
EH-460 MGQH	6	36.5	EH-359 MGQT, 3909 MGQT, 5153 MGQT, 991 MGQT, EH-358 MGQT, 2149 MGQH
2460 MGQH	6	36.83	EH-359 MGQT, 3909 MGQT, 5153 MGQT, 991 MGQT, EH-358 MGQT, 2149 MGQH
EH-358 MGQH	6	39	EH-359 MGQT, 3909 MGQT, 5153 MGQT, 991 MGQT, EH-358 MGQT, 2149 MGQH
2149 MGQH	6	50	EH-359 MGQT, 3909 MGQT, 5153 MGQT, 991 MGQT, EH-358 MGQT, EH-348 MGQH, EH-460 MGQH, 2460 MGQH, EH-358 MGQH

Alpha=0.050 Error Term=S DF=50 MSE=6.550833 Critical Value=4.681458

MGQH – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y n-hexano, MGQT – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y tolueno, MGQM – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.20 Comparación múltiple de medias de biomasa en medio mineral con glucosa y quitina coloidal e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Biomasa (g/caja)	Grupos diferentes
MGQM	46	5.97E-03	MGQH, MGQT
MGQH	46	2.96E-02	MGQM
MGQT	46	3.30E-02	MGQM

Alpha=0.050 Error Term=S DF=69 MSE=5.300672E-04 Critical Value=3.387496

MGQH – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y n-hexano, MGQT – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y tolueno, MGQM – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.21 Comparación múltiple de medias de biomasa en medio mineral con quitina e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Lecturas	Biomasa (g/ml)	Grupos diferentes
ATCC46578 MGQM	2	0.0242	1029 MGQT, ATCC26854 MGQH, 2149 MGQH, 974 MGQH, EH-459 MGQH, 157 MGQH, 2149 MGQM
5129 MGQM	2	0.0287	2149 MGQH, 974 MGQH, EH-459 MGQH, 157 MGQH, 2149 MGQM
974 MGQT	2	0.0398	974 MGQH, EH-459 MGQH, 157 MGQH, 2149 MGQM
5153 MGQT	2	0.0399	974 MGQH, EH-459 MGQH, 157 MGQH, 2149 MGQM

5129 MGQT	2	0.0429	974 MGQH, EH-459 MGQH, 157 MGQH, 2149 MGQM
2009 MGQT	2	0.0438	974 MGQH, EH-459 MGQH, 157 MGQH, 2149 MGQM
1029 MGQT	2	0.0456	ATCC46578 MGQM, 157 MGQH, 2149 MGQM
ATCC26854 MGQH	2	0.0478	ATCC46578 MGQM, 157 MGQH, 2149 MGQM
2149 MGQH	2	0.0591	ATCC46578 MGQM, 5129 MGQM, 157 MGQH, 2149 MGQM
974 MGQH	2	0.0654	ATCC46578 MGQM, 5129 MGQM, 974 MGQT, 5153 MGQT, 5129 MGQT, 2009 MGQT, 157 MGQH, 2149 MGQM
EH-459 MGQH	2	0.0662	ATCC46578 MGQM, 5129 MGQM, 974 MGQT, 5153 MGQT, 5129 MGQT, 2009 MGQT, 157 MGQH, 2149 MGQM
157 MGQH	2	0.0889	ATCC46578 MGQM, 5129 MGQM, 974 MGQT, 5153 MGQT, 5129 MGQT, 2009 MGQT, 1029 MGQT, ATCC26854 MGQH, 2149 MGQH, 974 MGQH, EH-459 MGQH
2149 MGQM	2	0.0945	ATCC46578 MGQM, 5129 MGQM, 974 MGQT, 5153 MGQT, 5129 MGQT, 2009 MGQT, 1029 MGQT, ATCC26854 MGQH, 2149 MGQH, 974 MGQH, EH-459 MGQH

Alpha=0.050 Error Term=S DF=13 MSE=2.885154E-05 Critical Value=5.625381

MGQH – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y n-hexano, MGQT – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y tolueno, MGQM – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.22 Comparación múltiple de medias de diámetro de hifas en medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
MGQH	3106	0.7131	MGQT
MGQM	448	0.7242	MGQT
MGQT	2675	1.0991	MGQH, MGQM

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=6226 MSE=2.754891E-02 Critical Value=3.314497

MGQH – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y n-hexano, MGQT – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y tolueno, MGQM – Medio mineral con glucosa, quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.23 Comparación múltiple de medias de diámetro de hifas en medio mineral con glucosa, quitina coloidal e hidrocarburos de las mejores cepas.

Tratamiento	Diámetro	Grupos diferentes
-------------	----------	-------------------

	(μm)	
2460 MQGH	0.7141	2832 MQGM, 975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
975 MQGH	0.7169	2832 MQGM, 975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
ATCC26854 MQGM	0.7309	975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
2858 MQGH	0.7316	975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
EH-459 MQGH	0.7321	975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
3909 MQGM	0.7337	975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
3909 MQGH	0.7373	975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
EH-460 MQGM	0.7388	975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
ATCC46578 MQGM	0.7606	975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
2832 MQGM	0.8208	2460 MQGH, 975 MQGH, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
975 MQGM	0.9032	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
157 MQGT	1.1360	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 2832 MQGM, 975 MQGM, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
Bb MQGT	1.1366	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 2832 MQGM, 975 MQGM, ATCC26854 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
991 MQGT	1.1560	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 2832 MQGM, 975 MQGM, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
2009 MQGT	1.1942	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-

		460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 2832 MQGM, 975 MQGM, 157 MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
ATCC26854 MQGT	1.2071	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 2832 MQGM, 975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, ATCC46578 MQGT, EH-460 MQGH
ATCC46578 MQGT	1.2810	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 2832 MQGM, 975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT
EH-460 MQGH	1.3198	2460 MQGH, 975 MQGH, ATCC26854 MQGM, 2858 MQGH, EH-459 MQGH, 3909 MQGM, 3909 MQGH, EH-460 MQGM, ATCC46578 MQGM, 2832 MQGM, 975 MQGM, 157 MQGT, Bb MQGT, 991 MQGT, 2009 MQGT, ATCC26854 MQGT

Alpha=0.050 Error Term=S DF=1699 MSE=1.778067E-02 Critical Value=4.933754

MGQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MQGT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno, MQGM – Medio mineral con quitina coloidal y mezcla de n-hexano y tolueno.

Tabla AIII.24 Comparación de diámetro de hifas de *Lecanicillium lecanii* 991 en medio superficial.

Tratamiento	Lecturas	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
MGQH	18	0.8257	MH
MH	59	0.6088	MGQH

Alpha=0.050 Error Term=S DF=75 MSE=5.106829E-03

MGQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MH – Medio mineral con n-hexano.

Tabla AIII.25 Comparación de diámetro de esporas de *Lecanicillium lecanii* 991 en medio superficial.

Medición	Medio	Lecturas	Diámetro (µm)	Grupos diferentes
Largo	MGQH	6	2.0786	
Largo	MH	6	2.2022	
Ancho	MGQH	12	0.9844	
Ancho	MH	12	1.0151	

Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=9.869053E-02

MGQH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MH – Medio mineral con n-hexano.

Evaluación de cepas degradadoras de hidrocarburos

Tabla AIII.26 Comparación múltiple de medias de pH en medio líquido variando la fuente de carbono.

Tratamiento	Lecturas	pH	Grupos diferentes
MH	6	5.67	MQH, MQT
MT	6	5.69	MQH, MQT
MQH	6	5.91	MH, MT
MQT	6	5.92	MH, MT

Alpha=0.050 Error Term=S DF=12 MSE=1.133333E-03 Critical Value=4

MH – Medio mineral con n-hexano, MT – Medio mineral con tolueno, MM – Medio mineral con mezcla de n-hexanos y tolueno.

Tabla AIII.27 Comparación múltiple de medias de cepas de *Lecanicillium* en medio líquido con hidrocarburos.

Cepa	Lecturas	pH	Grupos diferentes
2149	8	5.8	
EH-460	8	5.8	
157	8	5.8	

Alpha=0.050 Error Term=S DF=12 MSE=1.133333E-03 Critical Value=3.77295

Tabla AIII.28 Análisis de varianza para la selección de cepas degradadoras de hidrocarburos con actividad de N-acetil-hexosaminidasa, en medio líquido con o sin quitina coloidal e hidrocarburos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (Alpha=0.05)
A: Medio	1	5.87E-05	1005.46	0.000000*	1
B: Hidrocarburo	1	1.02E-06	17.44	0.000072*	0.984903
AB	1	1.31E-06	22.34	0.000009*	0.996656
C: Cepa	2	1.76E-05	301.41	0.000000*	1
AC	2	1.75E-05	300.23	0.000000*	1
BC	2	1.38E-06	23.69	0.000000*	0.999995
ABC	2	1.59E-06	27.24	0.000000*	1
S	84	5.84E-08			
Total (Adjusted)	95				
Total	96				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla AIII.29 Comparación múltiple de medias de actividad de N-acetil-hexosaminidasa de cepas de *Lecanicillium* en medio líquido e hidrocarburos con o sin quitina coloidal.

Medio	Lecturas	NHasa	Grupos diferentes
M	48	2.00E-04	MQ
MQ	48	1.76E-03	M

Alpha=0.050 Error Term=S(ABC) DF=84 MSE=5.842469E-08 Critical Value=2.812328

MQ – Medio mineral con quitina coloidal, M – Medio mineral

Tabla AIII.30 Comparación múltiple de medias de actividad N-acetil-hexosaminidasa de cepas de *Lecanicillium* en medio líquido con la mezcla de hidrocarburos.

Hidrocarburo	Lecturas	NHasa (U/ml)	Grupos diferentes
n-hexano	48	8.79E-04	Tolueno
Tolueno	48	1.08E-03	n-Hexano

Alpha=0.050 Error Term=S(ABC) DF=84 MSE=5.842469E-08 Critical Value=2.812328

Tabla AIII.31 Comparación múltiple de medias de actividad N-acetil-hexosaminidasa de cepas de *Lecanicillium* en medio líquido con hidrocarburos.

Cepa	Lecturas	NHasa (U/ml)	Grupos diferentes
157	32	5.01E-04	EH-460
2149	32	6.08E-04	EH-460
EH-460	32	1.84E-03	157, 2149

Alpha=0.050 Error Term=S(ABC) DF=84 MSE=5.842469E-08 Critical Value=3.374266

Tabla AIII.32 Análisis de varianza para la selección de cepas degradadoras de hidrocarburos con actividad de endoquitinasas, en medio líquido con o sin quitina coloidal e hidrocarburos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (Alpha=0.05)
A: Medio	1	7.63E+01	18.13	0.000053*	0.987737
B: Hidrocarburo	1	1.91E+01	4.53	0.036186*	0.557514
AB	1	1.44E+01	3.43	0.067646	0.448407
C: Cepa	2	4.89E+00	1.16	0.317498	0.24898
AC	2	1.82E+01	4.32	0.016370*	0.736418
BC	2	1.75E+01	4.15	0.019053*	0.718379
ABC	2	2.88E+01	6.84	0.001771*	0.912271
S	84	4.21E+00			
Total (Adjusted)	95				
Total	96				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla AIII.33 Comparación múltiple de medias de actividad de endoquitinasas de medios con diferente fuente de carbono.

Cepa	Lecturas	Endoquitinasas (U/ml)	Grupos diferentes
MT	24	3.64	MQH
MH	24	3.75	MQH
MQT	24	4.65	MQH
MQH	24	6.31	MT, MH, MQT

Alpha=0.050 Error Term=S DF=84 MSE=4.208195 Critical Value=3.706976

MH – Medio mineral con n-hexano, MT – Medio mineral con tolueno, MH – Medio mineral con quitina coloidal y n-hexano, MT – Medio mineral con quitina coloidal y tolueno,

Tabla AIII.34 Comparación múltiple de medias de actividad de endoquitinasas de cepas de *Lecanicillium* en medio líquido e hidrocarburos con o sin quitina coloidal.

Cepa	Lecturas	Endoquitinasas (U/ml)	Grupos diferentes
2149	32	4.273256	
EH-460	32	4.476744	
157	32	5.02907	

Alpha=0.050 Error Term=S(ABC) DF=84 MSE=4.208195 Critical Value=3.374266

Tabla AIII.37 Análisis de varianza para la selección de cepas degradadoras de hidrocarburos y productoras de azúcares reductores en medio líquido con quitina coloidal e hidrocarburos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de Cuadrados	F	Nivel de probabilidad	Nivel de significancia (Alpha=0.05)
A: Hidrocarburo	1	6.06E-04	934.04	0.000000*	1
B: Cepa	2	2.89E-04	445.76	0.000000*	1
AB	2	1.62E-04	249.75	0.000000*	1
S	42	6.48E-07			
Total (Adjusted)	47				
Total	48				

* Term significant at alpha = 0.05

Tabla AIII.38 Comparación múltiple de medias de azúcares reductores en medio líquido e hidrocarburos.

Medio	Lecturas	DNS (µg/ml)	Grupos diferentes
tolueno	24	1.28	n-hexano
n-hexano	24	8.39	tolueno

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=42 MSE=6.483962E-07 Critical Value=2.85401

Tabla AIII.39. Comparación múltiple de medias azúcares reductores de en medio líquido de cepas de *Lecanicillium*.

Medio	Lecturas	DNS ($\mu\text{g/ml}$)	Grupos diferentes
2149	16	6.25E-2	157, EH-460
157	16	6.24	2149, EH-460
EH-460	16	8.21	2149, 15

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=42 MSE=6.483962E-07 Critical Value=3.435838

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

I.B.I. MARÍA DEL CARMEN MARÍN CERVANTES.

El día 24 de Agosto de 2006

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

H. Jurado

Presidente: Dr. Sergio Revah Moiseev.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ingeniería de Proceso e Hidráulica.

Secretario: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Sinodales: Dra. Raquel Alatorre Rosas

Colegio de Postgraduados Instituto de Fitosanidad.

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción.