RESEÑA ANALÍTICA

Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca

Osmel Luis Domínguez-Guilarte, Miguel Ramos-Leal, Ayixon Sánchez-Reyes, Ana Margarita Manzano -León, Juan Argüelles-Álvarez, María Isabel Sánchez-López y Gilda Guerra-Rivera.*

Dpto. Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 entre Calles J e I, El Vedado, La Habana, Cuba. Correo electrónico: osmeluis@fbio.uh.cu

Recibido: 27 de mayo de 2010. Aceptado: 1ro de enero de 2011.

Palabras clave: hongos de la podredumbre blanca, contaminantes orgánicos persistentes (COPs), DDT, enzimas ligninolíticas..
Key words: white-rot fungi, persistent organic pollutants (POPs), DDT, ligninolytic enzymes.

RESUMEN. Una de las causas más importantes que han alterado el medio ambiente de manera significativa es la acumulación en varios ecosistemas de sustancias de difícil degradación, entre las que destacan los compuestos orgánicos persistentes (bifenilos policlorados, plaguicidas, pesticidas y compuestos no intencionales). Estos son compuestos químicos extremadamente estables, propensos a viajar distancias considerables y resistentes a los procesos de degradación natural. La mayoría de ellos se utilizan como plaguicidas y como productos químicos en procesos industriales o como subproductos que se generan de manera no intencional a partir de ciertas actividades humanas, tales como los procesos de combustión o generación de energía. En el caso del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), se ha encontrado en lugares donde no ha sido aplicado, tal y como ocurre en las zonas árticas. Los hongos de la podredumbre blanca son un grupo de microorganismos que desempeñan un papel clave como reguladores del ciclo del carbono. Son activos transformadores de la lignina. Sus enzimas ligninolíticas están directamente involucradas no solo en la degradación de la lignina, sino también, en la biotrasformación de una diversidad de polímeros orgánicos complejos de los cuales algunos constituyen contaminantes ambientales, con una estructura química similar a la lignina. Esto se debe a la inespecificidad de su sistema multienzimático, lo que abre el espacio para su incorporación en procesos de biorremediación. En este trabajo, se presentan resultados preliminares de la inducción de las enzimas ligninolíticas lacasa y MnP con la utilización del DDT como inductor de las actividades enzimáticas mediante cepas nativas de hongos de la podredumbre blanca.

ABSTRACT. One of the most important causes that it has changed the environment in a significative way, is the accumulation of a group of difficult degradation substance, so- called Persistent Organic Compounds (biphenyls polichlorinated, plaguicides, pesticides and non-intentional compounds). Those are chemicals very stable that are able to travel considerable distances. They are resistant to natural degradation processes. Most of them are used as plaguicides, some to be used as chemicals in industrial processes and others are used as by-products that are generated in a non intentional way starting from certain human activities, such as the combustion processes or energy generation. In DDT case, it has been found in places where it has not been applied, as occurs in artic zones. White-rot fungi are key regulators in carbon cycle. Those microorganisms are active degraders of the lignin. Its ligninolytic enzymes are not only directly involved in the degradation of the lignin but also in the degradation of a wide range of organic complex polymers, some environmental pollutants, with a similar chemical structure to lignin. This is due to the unspecificity of its multienzymatic system; this characteristic opens a space for bioremediation processes. In this paper the authors show preliminary results of laccase and MnP ligninolytic enzymes induction using DDT as inducer of enzymatic activities employing native White-rot fungi strains.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental constituye uno de los problemas más críticos en el mundo actual. Por tal motivo, la investigación de los agentes contaminantes y cómo se originan constituyen prioridades a resolver por la ciencia moderna. A medida que aumenta la interacción del hombre con la naturaleza y aparecen nuevas necesidades como consecuencia de la vida en sociedad, el medio ambiente que lo rodea se deteriora cada vez más. Las evidencias de que el desarrollo industrial, el crecimiento de la población y la sobreexplotación de los recursos naturales han conducido a una severa degradación ambiental, son irrefutables.[1]

Se denomina contaminación ambiental a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivas para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o bien, que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de ellos.[2]

El desarrollo de las sociedades contemporáneas en las últimas décadas ha estado asociado al uso de compuestos sintéticos fabricados por el hombre, conocidos como xenobióticos, los cuales entran directa o indirectamente

al ambiente, contaminándolo y generando problemas severos a la salud humana, además de poner en riesgo la sobrevivencia de muchas especies.[3]

Por todas estas razones, uno de los grandes retos de la humanidad en este inicio del siglo XXI es convertir los procesos productivos en limpios y eficientes energéticamente. Por otro lado, se requiere tener la capacidad tecnológica para restaurar los ambientes dañados por la acción de estos compuestos. La biotecnología tiene un papel importante que desempeñar en esta transformación.[4]

La utilización de microorganismos en los procesos de biorremediación ha aumentado en los últimos años. Los hongos de la podredumbre blanca (HPB) constituyen un grupo de microorganismos que crecen en suelos ricos en materia orgánica, troncos y desechos agrícolas como pulpa de café y bagazo de caña de azúcar. Estos microorganismos tienen la capacidad de transformar y degradar el material lignocelulósico, debido a la presencia de un sistema enzimático extracelular inespecífico que está implicado en la biodegradación de la lignina, por lo que desempeñan un papel fundamental dentro del ciclo del carbono en el planeta.[5] Entre estas enzimas ligninolíticas se encuentran la lacasa, la manganeso-peroxidasa (MnP), la lignina-peroxidasa (LiP) y otras oxidasas. Estas enzimas catalizan la oxidación de la lignina, pero su naturaleza inespecífica les permite la degradación de compuestos xenobióticos con estructura química similar a la de la lignina, como por ejemplo: colorantes y efluentes textiles, plaguicidas como el dicloro-difenil -tricloroetano (DDT), bifenilos policlorados, entre otros; además de emplearse en la bioconversión de desechos agrícolas.[6]

El objetivo de este trabajo consistió en informar el efecto adverso de los contaminantes orgánicos persistentes sobre los ecosistemas y demostrar la acción de los hongos de la podredumbre blanca sobre estas sustancias.

Contaminantes orgánicos persistentes

En los años cuarentas del siglo pasado, se comenzó a utilizar una serie de productos químicos de gran estabilidad, poco degradables y que, una vez introducidos en el ambiente, han dado lugar a los llamados contaminantes orgánicos persistentes, también conocidos como COPs. Estos son compuestos químicos orgánicos generalmente halogenados, utilizados en diversas aplicaciones de carácter industrial. También son generados de manera no intencional como subproductos de la combustión en determinadas actividades y procesos industriales o indistintamente.[7]

Aunque pueden existir muchas formas diferentes de COPs, tanto naturales como antrópicas, los que se destacan por sus características de persistencia y bioacumulación incluyen a los plaguicidas organoclorados, con acción insecticida; productos químicos industriales como los bifenilos policlorados, el hexaclorobenceno y otros productos secundarios industriales como las policloro -dibenzo-dioxinas (dioxinas) y los policloro-dibenzo -furanos (furanos).[8]

La mayoría de estos compuestos se sintetizaron para ser utilizados como plaguicidas, por ejemplo: lindano, aldrín, clordano, carbofurán, DDT, entre otros. En cambio, los bifenilos policlorados se fabricaron para ser utilizados como dieléctricos en transformadores, retardantes de llama, aceites de alta estabilidad térmica, entre otros.[9]

Otros se sintetizaron como productos puros, pero a menudo la producción y utilización se hizo en forma de mezclas, como es el caso de los hexaclorociclohexanos y los toxafenos. En otros casos, estos compuestos se han transformado en otros productos, por ejemplo el DDT en dicloro-difenil-dicloroetileno (DDE), lo que también aumentó el número total de contaminantes orgánicos persistentes en los ecosistemas.[10]

En Cuba, considerando las regulaciones nacionales de prohibición de uso, las cuales se encuentran en vigencia desde hace más de 15 años, las cantidades de formulaciones plaguicidas con características COPs que fueron identificadas en el ámbito nacional resultaron relativamente pequeñas y correspondieron a los productos DDT, heptacloro y toxafeno, con una mayor contribución del primero de estos. En orden de contribución a las existencias nacionales en desuso de formulaciones plaguicidas con características COPs, Pinar del Río es la provincia que más cantidades tiene, le siguen Granma, Sancti Spíritus, La Habana, Villa Clara y Ciudad de La Habana. El Ministerio de la Agricultura constituye el organismo de mayor contribución a las existencias nacionales de estos tipos de productos, lo cual está en correspondencia con la naturaleza de las actividades de producción agrícola que realizaba hace algunos años.[7]

Características generales

Por definición, los COPs son muy resistentes a la degradación biológica, fotolítica o química. El enlace carbono-carbono es muy estable frente a la hidrólisis y cuanto mayor es el número de sustituciones de átomos de hidrógeno por átomos de cloro o grupos funcionales o ambos, más elevada es la resistencia a la degradación biológica y fotolítica. Debido a su elevado grado de halogenación, tienen una solubilidad muy baja en agua y elevada en lípidos, lo que les da la propiedad de difundir fácilmente a través de la estructura fosfolipídica de las membranas biológicas y acumularse en los depósitos de grasa.[11,12]

Numerosos estudios científicos corroboran que los COPs constituyen el grupo de contaminantes más peligrosos que se liberan al medio ambiente, debido a que presentan las características siguientes: son tóxicos y causan efectos perjudiciales a la salud de los seres humanos y la fauna silvestre; son persistentes, con lo cual permanecen en el medio ambiente por prolongados períodos de tiempo, antes de degradarse a formas menos peligrosas; son semi-volátiles y poseen la capacidad de evaporarse y desplazarse a largas distancias, a través del aire y el agua;[13] se acumulan en el tejido adiposo de los seres vivos.[14] En los seres humanos, los efectos de la exposición a grandes dosis de COPs pueden inducir malformaciones congénitas, cáncer, trastornos hormonales, daños renales y respiratorios, disfunciones de los sistemas inmunológico, nervioso y reproductivo e incluso, problemas en el desarrollo intelectual.[15]

En mayo de 2001, en Estocolmo, Suecia, 127 países adoptaron un tratado de las Naciones Unidas para prohibir o minimizar el uso de 12 de las sustancias tóxicas más utilizadas en el mundo, consideradas causantes de cáncer y defectos congénitos en personas y animales. Las sustancias COPs objeto de este convenio incluyen ocho plaguicidas entre los que destaca el DDT, dos productos industriales entre los que aparecen los bifenilos policlorados y dos subproductos de diversos procesos de combustión: las dioxinas y los furanos.[16]

El convenio de Estocolmo complementa otros acuerdos y planes de acciones mundiales o regionales relacionadas con el manejo de productos químicos, en especial, los Convenios de Basilea en 1989 sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación y de Rotterdam en 1998 so-

bre el procedimiento de consentimiento fundamentado para productos químicos peligrosos y plaguicidas en el comercio internacional.[17]

Actualmente en Cuba, se desarrollan trabajos orientados a llevar a cabo el Plan de Aplicación Nacional del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, incluyendo el cumplimiento de los compromisos internacionales derivados de la aplicación nacional de los Convenios de Rotterdam y Basilea.

La incertidumbre asociada al manejo de los COPs, incluye entre otras cuestiones fundamentales, la insuficiente cobertura de tratamiento y disposición final de sus desechos; la ausencia de normas nacionales para el manejo adecuado de estas sustancias; las limitaciones e insuficiencias de los mecanismos existentes para el intercambio de información y el bajo nivel de sensibilización existente entre los directivos, técnicos, trabajadores y público en general.[18]

Bifenilos policlorados

Los bifenilos policlorados son un grupo de compuestos químicos sintetizados por el hombre, entre los cuales hay sustancias de diferente toxicidad. Por su poder aislante y no ser inflamables, algunos de ellos se han utilizado extensivamente como líquidos refrigerantes y lubricantes en transformadores y otros equipos eléctricos. En muchos países, se dejaron de fabricar a finales de la década de los setentas, cuando se encontraron signos de su toxicidad ambiental.[19]

Químicamente son un grupo de 209 hidrocarburos aromáticos clorados de composición general $C_{12}H_{10}$-$nCl_{n.}$[20] Todos los bifenilos policlorados son solubles en aceites y disolventes orgánicos. Presentan estabilidad química en un intervalo de temperatura de 170 a 300 °C . Las dioxinas, compuestos muy tóxicos, pueden ser encontradas como impurezas en los bifenilos policlorados comerciales y constituyen una de sus grandes desventajas.[21]

Llegan a la atmósfera por evaporación, por lo que el proceso lo favorecen las temperaturas elevadas. Se condensan en aerosoles y se dispersan. Las tasas de evaporación son mayores para suelos que para cuerpos de agua, dependiendo de la textura del suelo. Se degradan poco y su persistencia aumenta en relación directa con el grado de cloración. Ingresan a los organismos acuáticos a través de diversas fuentes y por deslavado de la atmósfera.[22]

No debe esperarse una descomposición por hidrólisis, puesto que son estables, incluso en presencia de ácidos y álcalis fuertes. La descomposición por oxidación se produce con gran consumo de energía.[23] La degradación microbiológica se da en condiciones aeróbicas. La adsorción y transición a condiciones anaerobias interrumpen el proceso de descomposición en el suelo.[24] La degradación fotoquímica de estos compuestos puede ser una ruta para su eliminación del ambiente. Experimentos fotoquímicos conducidos bajo condiciones naturales simuladas en un determinado número de clorobifenilos puros y preparaciones comerciales han demostrado reacciones de degradación tales como decloración y solvólisis.[25] La mineralización es posible por efecto de irradiación ultravioleta.[26] El proceso de descomposición concluye con la formación de CO_2, ácido clorhídrico, dioxinas y furanos.

Cerca del 25 % de los bifenilos policlorados asimilados por el ser humano ingresan al organismo por inhalación y el 75 % restante a través de productos alimenticios.[27]

La cantidad global de bifenilos policlorados producida anualmente es de 1,3 millones de toneladas (un 97 % de estas en el hemisferio norte). La mayor parte de estos compuestos han quedado retenidos en los suelos de las zonas donde se utilizaron o se produjeron. A pesar de ello, una parte ha pasado a la atmósfera y se ha acumulado en las zonas más frías del planeta. Se ha visto, sin embargo, que este proceso de acumulación por efecto de condensación no solamente afecta estas lejanas zonas, sino también, a las montañosas. En muchos casos, lo que se observa es una transferencia neta de contaminantes a ecosistemas de zonas lejanas, producida por un proceso de evaporación (dilución) y posterior condensación (concentración).[28]

Plaguicidas

Los plaguicidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de plagas (insectos, hongos, nemátodos, etc.). Así, desde el descubrimiento del primer insecticida sintético -el DDT- en los años cuarenta, la utilización de plaguicidas en el mundo no ha dejado de crecer.[29]

La aplicación de plaguicidas sintéticos ha sido una práctica rutinaria en la agricultura en los últimos cincuenta años. El uso indiscriminado de estos compuestos, soporta el hecho de que en la actualidad se estén acumulando grandes cantidades de plaguicidas y productos de su degradación en el ambiente, los cuales se asocian con riesgo potencial para la salud humana.[30,31]

Se sostiene que es indudable el gran beneficio derivado del empleo de los plaguicidas en la lucha contra enfermedades transmitidas por vectores o con huéspedes intermediarios.[32] Pero también se ha señalado el riesgo potencial para la vida animal y humana derivado de la exposición continuada a compuestos químicos diseñados como biocidas. Actualmente, se comercializan más de 1 500 tipos de plaguicidas en el orbe. Los países en desarrollo representan cerca de la cuarta parte de la totalidad de las naciones que emplean estos compuestos. Sin embargo, si se trata solo de insecticidas, el porcentaje se incrementa a 50.[33]

El incremento en la producción y uso de compuestos químicos en los últimos cien años ha dado origen a una preocupación creciente sobre el efecto que pueden tener sobre los ecosistemas. Debido a sus características químicas, los plaguicidas son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el ambiente puede ser elevada. Actualmente, los residuos de plaguicidas han sido identificados en todos los compartimientos ambientales (aire, agua y suelo) y en todas las regiones geográficas, incluyendo aquellas muy remotas al sitio original de su liberación. Igualmente se ha demostrado su presencia en organismos de todos los niveles tróficos, desde el plancton hasta las ballenas y los animales del ártico.[34,35]

En el ámbito nacional, la situación tiene gran semejanza con lo que ocurre en el resto del mundo. En Cuba, se llevó a cabo en 2006 un Inventario Nacional de Plaguicidas, el cual fue realizado en el marco de la ejecución del Plan de Aplicación Nacional del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Las conclusiones de dicho inventario hablan por sí mismas, ya que se identificaron en el ámbito nacional, 18 instalaciones que poseen en su conjunto 10,6 t de formulaciones plaguicidas con características COPs, entre los que se incluyen DDT, heptacloro y toxafeno. Las mayores disponibilidades de plaguicidas COPs le corresponden a las formulaciones plaguicidas que poseen como ingrediente activo al DDT, con un 72 % (7,7 t) de las

cantidades totales existentes. Las mayores existencias de formulaciones plaguicidas con características COPs y formulaciones plaguicidas no identificadas corresponden a la provincia de Pinar del Río, la cual posee el 88,69 y 89,47 % respectivamente de las existencias nacionales de este tipo de productos.[7]

Dicloro-difenil-tricloroetano

El DDT es un potente plaguicida perteneciente al grupo de los organoclorados. Fue sintetizado en 1874 por el alemán Tomas Zeidler, pero su empleo comenzó en 1939 cuando el químico suizo Paul Herman Müller descubrió sus propiedades insecticidas y su baja toxicidad para los humanos. Este científico recibió el Premio Nobel en 1948 en reconocimiento al impresionante avance que este producto había representado en la lucha contra las enfermedades y las plagas. Resultó sumamente efectivo como insecticida debido a lo cual se comenzó a usar, junto con sus análogos de grupo en forma masiva e indiscriminada en campañas contra el paludismo y otras enfermedades insidiosas con valiosos resultados. Una de las razones de su gran éxito fue el bajo costo; pero además, por su modo de empleo simple, bastaba un tratamiento al año, a veces cada dos o tres años, y se podía erradicar cualquier insecto.[36]

Su nombre químico por la IUPAC es 1,1,1-tricloro-2,2-*bis*(4-clorofenil)etano. Presenta varios nombres comerciales, en su mayoría procedentes del nombre de la firma productora. Por ejemplo: 1,1,1-tricloro-2,2-*bis* (*p*-clorofenil)etano; Anofex; Pentachlorin; Neocidol, entre otros.

Se calcula que en los primeros años de uso del DDT se evitó la muerte de cinco millones de personas cada año, además de la protección de cosechas y del aniquilamiento de insectos domésticos. Así, por ejemplo, en la India, en 1952 hubo 75 millones de casos de malaria y en 1964, después de utilizar masivamente el DDT, se redujeron los casos a 100 000.[37]

Sin embargo, paulatinamente su empleo se fue restringiendo. Entre los factores determinantes de su prohibición influyó la constatación de que en mamíferos de zonas remotas donde no se había utilizado nunca, por ejemplo ballenas y osos de zonas árticas, se encontraron cantidades de este compuesto. Otro criterio tomado en cuenta fue la interferencia con funciones reproductivas en las aves.[38] Otro problema es la resistencia que muchos organismos desarrollaron con el uso creciente del DDT por lo que para enfrentarlos había que emplear cantidades cada vez mayores del producto y con menor eficacia. De ser un benefactor de la humanidad pasó a ser enemigo público entre los años 1970 y 1980 y con ello sobrevino su total prohibición. Afortunadamente, su supresión coincidió con el desarrollo de nuevos insecticidas, como los piretroides, con características menos peligrosas.[39] Sin embargo, por su gran eficiencia y a despecho de la Convención de Estocolmo y otros posibles acuerdos, en casos de epidemia descontrolada, reaparece como eficaz control de un elevado número de vectores.

El formulado que se emplea en el campo que contiene DDT es un sólido ceroso de color blanco o crema, o un polvo amorfo. Es de una composición variable y puede consistir en 11 o más compuestos; principalmente los isómeros pp'- (hasta un 85 %), op'-(15 al 30 %) y oo'-DDT en menor cantidad. Sus cristales pueden presentarse sin olor o con olor aromático ligero. Su punto de ebullición es igual a 260 °C . Su solubilidad en agua es igual a $5,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L a 25 °C, lo que lo hace prácticamente insoluble en esta. El DDT es soluble en la mayor parte de los disolventes aromáticos y clorados. Es muy soluble en lípidos. Esta sustancia en combustión forma gases tóxicos y corrosivos que incluyen al cloruro de hidrógeno. Se descompone a una temperatura de 110 °C y reacciona con el aluminio y el hierro.[40]

Toxicidad

El DDT es tóxico para la vida incluso a bajas concentraciones. Afecta a todos los niveles tróficos de los ecosistemas acuáticos, sobre todo, a los productores primarios que son sensibles. En los peces afecta la supervivencia, desarrollo, comportamiento y fisiología, con ello se altera su productividad y distribución, con las consecuentes disminuciones de recursos para la alimentación humana. Afecta además a la composición de las poblaciones de microorganismos del suelo, los ciclos naturales de nutrientes y la fertilidad. Asimismo, produce desequilibrios en las relaciones presa-depredador y descontrol en las poblaciones de plagas primarias.[41] Las aves son vulnerables a los efectos de este compuesto. En este grupo de animales afecta la supervivencia, reproducción y formación del cascarón de los huevos.[25]

El DDT es un potente neurotóxico que actúa fundamentalmente sobre el sistema nervioso central. Los síntomas externos se detectan por una disminución temporal de la transmisión sináptica seguida de un bloqueo total. Produce lesiones hepáticas principalmente en dosis elevadas.[42] En relación con la exposición de la población general, se han encontrado estudios que muestran una correspondencia entre la mutación de un oncogen, el *k*-ras, en enfermos de cáncer de páncreas exocrino y una mayor concentración de DDT, productos de su degradación y algunos congéneres de los bifenilos policlorados en humanos.[43]

Comportamiento en el medio ambiente

El DDT se encuentra en el aire en estado gaseoso, en forma de vapor, como aerosol y adsorbido en partículas de polvo. El vapor es eliminado de la atmósfera por reacciones con radicales hidroxilo, con una vida media de cinco días y las partículas son removidas al precipitarse con la lluvia y el polvo. Adsorbido en partículas de polvo puede ser transportado a miles de kilómetros antes de ser degradado por la luz solar y así se dispersa por todo el globo. Las concentraciones halladas en aguas pluviales permiten deducir que el DDT está distribuido en una proporción relativamente uniforme en todo el mundo.[44]

En los suelos se adsorbe a las partículas, por ello permanece prácticamente inmóvil y las posibilidades de que sea lixiviado a aguas subterráneas son bajas. En este medio es considerado un compuesto recalcitrante, pues se degrada muy lentamente por acción de los microorganismos aerobios; sin embargo, puede ser biodegradado en condiciones anaerobias. Su vida media en suelos de regiones templadas es de aproximadamente 5,3 años.[45] En los cuerpos de agua presenta una fuerte tendencia a la adsorción en partículas sólidas suspendidas, acumulándose en el sedimento donde se almacena por décadas y puede ser transportado hasta grandes distancias. Este compuesto es estable a la hidrólisis en condiciones ácidas, pero puede degradarse químicamente a pH elevado, formando DDE como principal producto.[46]

Degradación y productos de la descomposición del DDT

La biodegradación del DDT involucra un proceso de cometabolismo, en el cual, el microorganismo crece a expensas de un sustrato que utiliza como fuente de carbono y energía alternativa, y a la vez, es capaz de transformar el DDT y sus residuos sin que ello derive, en ocasiones, en una fuente de nutrientes o energía para

el crecimiento. Varios autores han publicado artículos que documentan la degradación bacteriana del DDT.[47,48]

En el género *Hidrogenomonas* se ha corroborado el mecanismo de degradación de este compuesto y además, se cuantificó la extensión del proceso de degradación.[24,49] Investigaciones recientes muestran la versatilidad metabólica de varios géneros con capacidad para degradar DDT y sus metabolitos más importantes a productos solubles, que luego entran en el ciclo de Krebs para ser mineralizados.[3]

Los basidiomicetos ligninolíticos han demostrado gran capacidad biodegradativa para un amplio espectro de COPs, incluido el DDT. Esta capacidad ha sido atribuida a su habilidad para degradar la lignina presente en la madera.[50] La mayoría de los trabajos sobre la degradación del DDT por hongos ligninolíticos se ha llevado a cabo utilizando como modelo el hongo *Phanaerochaete chrysosporium* en cultivos con bajo contenido de nitrógeno para inducir condiciones ligninolíticas. Todos estos estudios permitieron plantear una ruta para la degradación en hongos, la cual difiere de la propuesta para la degradación por bacterias. En los hongos, el DDD no es un producto de la degradación y el DDE se observó solo al principio del crecimiento, siendo degradado posteriormente; de ahí se infirió que este último se producía por un sistema distinto al de la degradación de la lignina. Se considera que esta vía es controlada por el sistema de las ligninasas del hongo.[51-55]

Enzimas ligninolíticas

De las enzimas que intervienen en la degradación de la lignina, las más estudiadas han sido las que están relacionadas con el ataque directo a los componentes lignocelulósicos. Pertenecen en su mayoría a uno de los grupos siguientes: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas, por lo que el término "enzimas ligninolíticas" generalmente se refiere a las enzimas de estos grupos. Por su obicuidad y su efecto sobre los COPs, se expondrán a continuación las principales características de las enzimas lacasa y manganeso-peroxidasa.

Lacasas

Las lacasas son glicoproteínas extracelulares que contienen usualmente cuatro átomos de cobre, pero son conocidas enzimas con dos, tres y seis átomos de este elemento.[56,57] Son enzimas monoméricas, diméricas o tretaméricas, con un peso molecular (PM) entre 60 y 390 kDa, un punto isoeléctrico (pI) entre 2,6 y 4,5 y un contenido de carbohidratos entre 15 y 20 %.[56,58]

Las lacasas son "oxidasas azules", que a diferencia de la mayoría de estas enzimas, reducen el oxígeno y producen agua en lugar de peróxido, además, han sido caracterizadas como enzimas de baja especificidad de sustrato.[59,60] Participan en la degradación de compuestos de bajo peso molecular derivados de la despolimerización de la lignina, como aldehídos, ácidos aromáticos e hidroquinonas. La oxidación de estas últimas, posibilita la producción del anión superóxido, que junto con el peróxido de hidrógeno, son los precursores del radical hidroxilo, el cual podría ser el responsable de la degradación inicial de la lignocelulosa, cuando esta no es accesible para las enzimas.[61]

Inicialmente se creía que los sustratos de las lacasas estaban restringidos a compuestos de tipo fenólico, pues su potencial de oxidación podría no ser lo suficientemente elevado como para producir la oxidación de estructuras no fenólicas. Sin embargo, recientemente se han presentado evidencias de que también son capaces de oxidar compuestos no fenólicos en presencia de mediadores redox.[62,63]

Otra prueba que demuestra el papel de las lacasas en la degradación de la lignina, fue la identificación de hongos de la podredumbre blanca, como *Trametes versicolor*, que pueden degradar eficientemente la lignina; ya que ensayos con mutantes lacasa negativos demostraron que disminuía notablemente la capacidad de degradación de este polímero.[64-66]

Manganeso peroxidasa (MnP)

En 1984, se demostró que parte de la actividad peroxidasa extracelular detectada en los cultivos de *Phanaerochaete chrysosporium* era dependiente de Mn^{2+}, lo que condujo al descubrimiento de las enzimas manganeso peroxidasas (MnP).[67] Inicialmente, se consideró que las MnP desempeñaban un papel secundario en la degradación de la lignina por su incapacidad de degradar dímeros no fenólicos. Sin embargo, dado que no todos los hongos que degradan la lignina producen LiP y que al igual que la lacasa, es una enzima presente en la mayoría de los hongos de la podredumbre blanca, su estudio ha despertado mayor interés.[68]

Al igual que la enzima lignina peroxidasa (LiP), es una glicoproteína que contiene un grupo hemo (hierro-protoporfirina IX) con PM entre 32 y 62 kDa, un pI entre 2,8 y 7,2 [59] y presenta un 57 % de identidad secuencial con la LiP.[69] En dependencia de la composición de los medios y las condiciones de cultivo, se han detectado isoenzimas de la MnP que proceden de genes distintos y tienen diferente regulación.[70]

La MnP oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+} y este último es el responsable de la oxidación de varios compuestos fenólicos. El Mn^{3+} es un oxidante con una vida media muy corta en medio acuoso. Los hongos de la podredumbre blanca secretan metabolitos aromáticos y alifáticos, incluyendo ácidos dicarboxílicos, que actúan como quelantes de iones metálicos. Estos no compiten con la enzima por el Mn^{2+} debido a su baja constante de unión, pero se unen al Mn^{3+} estabilizándolo en medio acuoso con un potencial de reducción elevado, por lo que pueden difundir en el medio de reacción y llegar a zonas donde la enzima no puede acceder.[71,72]

Inicialmente, se consideró que las MnP no eran capaces de degradar dímeros no fenólicos. Sin embargo, la oxidación biomimética de compuestos modelo de lignina por Mn^{3+}, ha sugerido que estas enzimas pueden estar involucradas en la oxidación de residuos de naturaleza fenólica y no fenólica.[73,74] Además, se ha demostrado que las MnP pueden promover la peroxidación de ácidos grasos insaturados y que este sistema de peroxidación de lípidos puede provocar la ruptura oxidativa de diferentes compuestos de naturaleza no fenólica.[74]

Hongos ligninolíticos y compuestos xenobióticos

Los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres, el cual permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos.[75] La diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos les confiere un uso potencial en biorremediación. Diferentes especies de basidiomicetos y las enzimas ligninolíticas purificadas a partir de estos hongos han demostrado su capacidad para degradar y mineralizar a la vez o indistintamente, un número de xenobióticos estructuralmente diverso y contaminante persistente en el medio ambiente como compuestos tóxicos de naturaleza fenólica y bajo peso molecular, por ejemplo: clorofenoles, bifenilos

policlorados, nitrotoluenos, colorantes industriales,[76] antraceno, fenantreno y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos;[77] plaguicidas;[78] polímeros sintéticos como poliacrilatos, poliacrilamida y nylon.[79]

Los contaminantes recalcitrantes, tales como bifenilos policlorados y explosivos aromáticos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos,[80] los plaguicidas clorados[81] y organofosforados[55] son todos efectivamente mineralizados a CO_2 por varias especies de hongos ligninolíticos. Además, la poca especificidad de las enzimas de estos organismos les permite degradar mezclas complejas de estos contaminantes.

Tratamientos biológicos para la remoción de sustancias recalcitrantes con estructura química compleja

El objetivo de las técnicas de tratamiento biológico es la creación de las condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y provocar la máxima destoxificación. La tecnología específica empleada en cada caso, depende del tipo de microorganismo de que se trate, de las condiciones del espacio contaminado, así como de la naturaleza y cantidad de contaminante o contaminantes. El tratamiento biológico del entorno contaminado, puede tener lugar en condiciones aerobias o anaerobias. En ambos casos, los productos intermedios que se forman como consecuencia del metabolismo microbiano, pueden ser menos, igual o más contaminantes que los originales.[82] El resultado final de un tratamiento de biodegradación depende en gran medida, de la toxicidad y la concentración inicial de los contaminantes, su biodegradabilidad, las propiedades del espacio contaminado y el sistema de tratamiento seleccionado.[83]

Las primeras investigaciones en este sentido llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana, estuvieron encaminadas a detectar la capacidad de dos cepas de basidiomicetos de la podredumbre blanca aislados en Cuba de producir las enzimas ligninolíticas lacasa y MnP en medio de cultivo Kimura suplementado con una concentración de 5 ppm del plaguicida organoclorado DDT. Se seleccionó este plaguicida debido a que en Cuba es del que mayor cantidad se dispone almacenada con características COPs. Además, existen suelos contaminados con DDT, conocidos como puntos calientes, que pueden ser reutilizados con fines agrícolas después de ser tratados con los HPB. La producción de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa por las cepas *Trametes maxima* (MUCL 44155) y *Ganoderma* aff. *zonatum* (B-18) fue estudiada en cultivos suplementados con 5 ppm de DDT (Fig. 1). Se observó que la cepa MUCL 44155 presentó una actividad lacasa de 69,71 $U \cdot L^{-1}$ en el medio suplementado con DDT, que no presentó diferencias significativas con respecto a la obtenida en el medio control (50,27 $U \cdot L^{-1}$). Los niveles de actividad enzimática lacasa obtenidos por *T. maxima* resultaron significativamente superiores a los alcanzados por *G. zonatum*, tanto en la variante suplementada con DDT como en su respectivo control.

A diferencia de la actividad lacasa, la biosíntesis de la enzima MnP no se favoreció con la adición de DDT. Las cepas cultivadas en los medios suplementados con DDT no presentaron diferencias significativas entre ellas, pero sí con el control (medio Kimura) de la cepa MUCL 44155, donde se encontró la máxima actividad enzimática (50,27 $U \cdot L^{-1}$). Este resultado sugiere que el DDT no induce la síntesis de MnP en las condiciones de cultivo ensayadas. Un resultado peculiar lo constituye la elevada actividad enzimática encontrada en el medio Kimura utilizado como control donde se dieron las condiciones favorables para la biosíntesis.

La cepa B-18 no mostró diferencias significativas en cuanto a producción de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa, mientras que la cepa MUCL 44155 produjo más lacasa que MnP en los medios con DDT.

Estos resultados muestran que existen diferencias significativas entre las cepas estudiadas en cuanto a la producción de las enzimas ligninolíticas lacasa y manganeso peroxidasa, lo que concuerda con otros trabajos,[80] en los que se plantea que es posible encontrar cepas (incluso de la misma especie) con diferencias en cuanto a la producción de enzimas ligninolíticas en dependencia de las condiciones de crecimiento. Existe una correspondencia directa entre la producción de enzimas ligninolíticas y los niveles de degradación.[84] Ha sido informada la dependencia existente entre la degradación de plaguicidas clorados, con los niveles de enzimas extracelulares y la cantidad de biomasa fúngica activa. Estos criterios se han utilizado con fines prácticos para la selección de hongos con elevada capacidad biodegradativa frente a compuestos xenobióticos.[85] Sin embargo, para el tratamiento biológico de ecosistemas contaminados con tales sustancias resulta conveniente la utilización de cepas que generen bajas concentraciones de biomasa con una elevada capacidad biodegradativa, lo que puede constituir también un buen criterio de selección.

La tendencia actual en el tratamiento de plagas está dirigida a la aplicación de agentes biológicos y la disminución del empleo de plaguicidas químicos. Los agentes

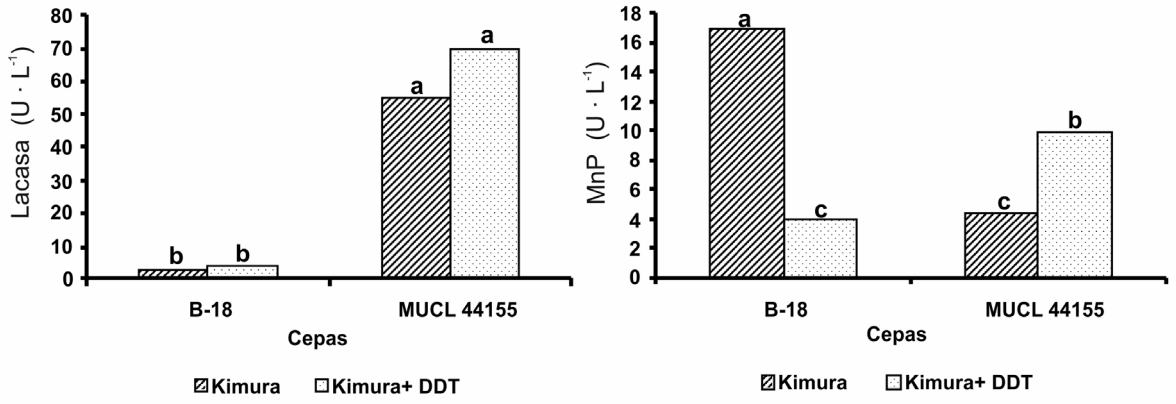


Fig. 1. *Actividades enzimáticas lacasa (izquierda) y MnP (derecha) de Ganoderma aff. zonatum (B-18) y Trametes maxima (MUCL 44155). La fermentación se llevó a cabo en erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de medio Kimura, a 28 ºC y 100 r · min⁻¹ en zaranda orbital durante 15 d . Letras diferentes indican significación estadística según la prueba SNK paramétrica ($p < 0,05$).*

biológicos son concebidos para actuar solamente sobre la especie dañina, lo que hace sostenible su empleo. La toma de conciencia sobre el empleo irracional de los plaguicidas químicos permitirá que las futuras generaciones puedan apreciar la gran diversidad de la naturaleza.[86]

CONCLUSIONES

Se reseñó el efecto adverso sobre los seres vivos de los contaminantes orgánicos persistentes y la acción que ejercen varios grupos de microorganismos, dentro de los que se destacan los hongos de la podredumbre blanca sobre esos compuestos de difícil degradación, por lo que su posible utilización es una alternativa para el tratamiento de ecosistemas contaminados con ellos.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este manuscrito fue apoyada por The International Foundation for Sciences (IFS) proyecto F/4442-1 a nombre de A.M. Manzano y por el proyecto DB-25 del Ministerio de la Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba a nombre de M. Ramos-Leal. A los integrantes del Laboratorio de Toxicología del Instituto de Sanidad Vegetal por suministrarnos gentilmente el DDT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Derache R. Toxicología y seguridad de los alimentos. Barcelona, España: Ediciones Omega: 1990:p.269-270.
2. Núñez JJ. La Ciencia y la Tecnología como procesos sociales. La Habana: Editorial Félix Varela: 1999:p.245.
3. Carrillo-Perez E, Ruiz-Manriquez A y Yeomans-Reina H. Aislamiento, identificación y evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT. Rev Int Contam Ambient. 2004;20(2):69-75.
4. Dávila G y Vázquez-Duhalt R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Mensaje Bioquímico. 2006;XXX:29-55.
5. Levin L, Papinutti F and Forchiasin F. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. Appl Biocro Technol. 2004;(94):169-176.
6. Martín C, González A y Blanco MJ. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev Iberoamer Micol. 2004;21:103-120.
7. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. Ministerio de la Agricultura. Inventario Nacional de Plaguicidas (COPs). República de Cuba. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Fondo para el Medio Ambiente Mundial, abril, 2006.
8. Shem SS and Kawamoto K. Enzyme production activity of Phanerochaete chrysosporium and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. Water Research. 2002;36:4445-4454.
9. Hackman III EE. Toxic organic chemicals: Destruction and waste treatment. New Jersey, United States of America: Noyes Data Corporation: 1978:p.285-317.
10. Hofrichter M, Vares K, Scheibner K, Galkin S, Sipilä J and Hatakka A. Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. J Biotechnol. 1999;67:217-228.
11. Purnomo AS, Kamei I and Kondo R. Degradation of 1,1,1-Tricloro-2,2-bis (4-Chlorophenyl) Ethane (DDT) by Brown-Rot Fungi. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2008;105(6):614-621.
12. Law WM, Lau WN, Lo KL, Wai LM and Chiu SW. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. Chemosphere. 2003;52:1531-1537.
13. Herkovits J. Efectos adversos de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en el periodo perinatal: compuestos tipo dioxinas. Arch Argent Pediatr. 2000;98(3):182-187.
14. Huang Y, Zhao X and Luan S. Uptake and biodegradation of DDT by 4 ectomycorrhizal fungi. Science of Total Environment. 2007;385:235-241.
15. Horton R. DDT for malaria control: the issue of trade. Lancet. 2007;369:248.
16. United Nations Environment Programme. Information Kit, Stockholm. Conference of Plenipotentiaries for the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. 2001.
17. Yarto M, Gavilán A, and Barrera J. El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes y sus implicaciones para México. Gaceta Ecológica del Instituto Nacional de Ecología. 2003; 069:7-28,
18. Mendoza-Orozco GM. Degradación de endosulfán por *Pleurotus spp*. Universidad Autónoma de Chiapas. México. Tesis en opción al título de Máster en Microbiología. 2006.
19. Reddy CA and Mathew Z. Bioremediation potential of white rot fungi. Fungi in bioremediation. GM. Gadd Cambridge, UK. 2001. Cambridge University Press.
20. Schultz A, Jonas U, Hammer E and Schauer F. Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase. Appl Environ Microbiol. 2001;67:4377-4381.
21. Otamendi G, Sabalza M, Glaciario M, Ferreiro H, Cattaneo C, Cari G, *et al*. Problemas ambientales agropecuarios y soluciones ambientales desde lo agropecuario. Temas de Medicina Ambiental. 2001;p167-171.
22. Abramowicz DA. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review. Critical Rev. Biotechnol. 1990;10:241-251.
23. Andreozzi R, Caprio V, Insola A and Marotta R. Advanced Oxidation Processes (AOP) for Water Purification and Recovery. Catalysis Today. 1999;53:51-59.
24. Nadeau LJ, Menn FM, Breen A and Sayler GS. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-*bis*(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. Applied and Environ Microbiol. 1994;60:51-55.
25. Breivik KR, Alcock Y, Li RE, Bailey H, Fiedler J and Pacyna M. Primary sources of selected POPs: regional and global scale emission inventories. Environ. Pollution. 2004;128:3-16.
26. Aust SD, Swaner PR and Stahl JD. Detoxification and metabolism of chemicals by white-rot fungi. Pesticide decontamination and detoxification. J. J. P. C. Zhu S. D. Aust A. T. Lemley Gan, 3-14. Washington, D.C.: Oxford University Press. 2003.
27. Carpenter DO. Polychlorinated biphenyls and human health. Int J Occup Med Environ Health. 1998;11(4):291-303.
28. Purnomo AS, Mori T and Kondo R. Involvement of Fenton reaction in DDT degradation by Brown-Rot Fungi. International Biodeterioration and Biodegradation. 2010;64:560-565.
29. Ibarra EJ, González A, Díaz H, Jaime A, González RM, Guevara T, *et al*. Exposición a plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en fumigadores de la campaña anti *Aedes aegypti* en Ciudad de la Habana de enero a marzo de 2002. Rev Cubana de Salud y Trabajo. 2002;3(1-2):51-54.
30. Bandala ER, Octaviano JA, Albiter V and Torres LG. Designing and Applying Treatment Technologies. G.B. Wickramanayake and R.E. Hinchee (Eds). Battelle Press. Columbus, Ohio, USA: 1998:p.177-182.
31. Wang X and Wang WX. Uptake, absorption efficiency and elimination of DDT in marine phytoplankton, copepods and fish. Environ Pollut. 2005;136(3):453-464.
32. Maroni M and Fait A. Health effects in men from long-term exposure to pesticides. Toxicology. 1993;78:1-18.
33. Longnecker MP, Rogan WJ and Lucier G. The human effects of DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) and PCBs (polychlorinated bisphenyls) and an overview of organochlorines in public health. Ann Rev Public Health. 1997;18:211-244.
34. Albert LA. Los plaguicidas persistentes y sus efectos a largo plazo. II Simp. Internac. sobre Agricultura Sostenible. México D.F. 1998.
35. Foght J, April T, Biggar K and Aislabie J. Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. Bioremediation Journal. 2001;5:225-246.
36. Waliszewski SM, Bermúdez MT, Silva CS, Infanzón RM, Carvajal O, Arroyo-Gómez S, *et al*. DDT'S, HCH and HCB levels in in breast adipose tissue in women with breast tumors. Rev. Int. Contam. Ambient. 2005;21(3):133-138.

37. Echarri L. Ciencias de la tierra y del medio ambiente. 2009. [Consultado: 20 de febrero de 2010]. Disponible en http://www.tecnun.es/Asignaturas/ecologia/Hipertexto/09ProdQui/110Pestic.html.
38. Christian V, Shrivastava R, Shukla D, Modi AH and Vyas BR. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. Indian J Exp Biol. 2005;43:301-312.
39. Fritsche W and Hofrichter M. Aerobic degradation by microorganisms. In: Rehm, H-J, Reed, G. (Eds.) Biotechnology-vol. 11b: Environmental Processes. Wiley-VCH, Weinheim, New York:199:p.145-167.
40. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). Reseña Toxicológica del DDT/DDE/DDD (edición actualizada) (en inglés), Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. Servicio de Salud Pública, 2002.
41. Johnson WW and Finley MT. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates, Resource Publication. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service. 1980;137:6-56.
42. Bidlan R and Manonmani HK. Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroetane (DDT) by *Serratia marcenses* DT- 1P. Process Biochemistry. 2002;38:49-56.
43. Vicuña R. Ligninolysis. A very peculiar microbial process. Mol Biotech. 2000;14:173-176.
44. Miersma N, Christopher A, Pepper B and Anderson T. Organochlorine pesticide in elementary school yards along the Texas–México border. Environ Pollution. 2003;28:65-71.
45. Yáñez L, Ortiz-Pérez D, Batres LE, Borja-Aburto L and Díaz-Barriga F. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltametrin in humans and environmental samples in malarious areas of México. Environ Research. 2002;88:174-179.
46. Shen L, Wania F, Lei YD, Teixeira C, Muir DC And Bidleman TC. Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in North America. Environ Science and Technol. 2005;15:409-415.
47. Wedemeyer G. Dechlorination of DDT by *Aerobacter aerogenes*. Science. 1966;152:647.
48. Masse R, Lalanne D, Messier F and Sylvestre M. Characterization of new bacteria transformation products of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by gas chromatography/mass spectrometry. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1989;18:741-752.
49. Levin L, Viale A and Forchiassin A. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. Internat. Biodeterioration & Biodegradation. 2003;52:1-5.
50. Barr D and Aust S. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. Environ Science and Technol. 1994;28(2):78-87.
51. Bumpus JA and SD Aust. Biodegradation of DDT 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chloro-phenyl)ethane by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl and Environ Microbiol. 1987;53:2001-2008.
52. Fernando T, Aust SD and Bumpus JA. Effects of culture parameters on DDT (1,1,1-trichloro-2,2-*bis*(4-chlorophenyl) ethane) biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Chemosphere. 1989;19:1387-1398.
53. Aust SD. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. Microbial Ecology. 1990;20:197-209.
54. Shah MM, Barr DP, Chung N and Aust SD. Use of white rot fungi for the degradation of environmental chemicals. Toxicology letters. 1992;64/65:493-501.
55. Bumpus JA, Kakar SN and Coleman RD. Fungal degradation of organophosphorus insecticides. Appl Biochem Biotechnol. 1993;39/40:715-726.
56. Thurston F. The structure and function of fungal laccases. In Microbiology. 1994;140:19-26.
57. Yaropolov AI, Skorobogatko OV and Vartanov SS. Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. In Appl. Biochem Biotechnol. 1994;49:257-279.
58. Wesenberg D, Kyriakides I and Spiros NA. White- rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dyes effluents. Biotech Advances. 2003;22:161-187.
59. Kahraman A, Sidel S and Gurdal IH. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. Appl Biores Technol. 2002;82:215.
60. Tavares APM, Coelho MAZ, Coutinho JAP and Xavier AMRB. Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2005;80:669-676.
61. Arantes V and Ferreira-Milagres AM. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+}-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. Enzyme and Microbial Technology. 2007;42(1):17-22.
62. Bourbonnais R, Paice RG, Leech D and Rochefort D. Laccase mediator bleaching of kraft pulps, identification of mediator active species and their role in oxidation of residual lignin subunits. 7th Internat. Conf. on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Vancouver. BC. Canadá, 1998.
63. Johannes C and Majcherczyck A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Appl Environ Microbiol. 2000;66:524-528.
64. Scheel T, Hofer M, Ludwing S and Hölker U. Differential expression of MnP and laccase in white rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. Appl Environ Microbiol. 2000;54:771-774.
65. Palmieri G, Gennamo G, Faraco V, Amonesano A, Sonia G and Giardina P. Atypical laccase isoenzyme from copper suplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. Enzyme and Microbial Technol. 2002; 33: 220-230.
66. Eggert C, Temp U and Erikson KEL. A fungal metabolite mediater degradation of non phenolic lignin structures and synthetic lignin by lacasse. FEBS Lett. 1997;391:144-148.
67. Pant D and Adholeya A. Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolourization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation. Biodegradation. 2006;18(5):647-653.
68. Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol Rev. 1994;13:125-135.
69. Sundaramoorth-Sundaramoorty M, Kishi K, Gold MH and Poulos TL. The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06 Å resolutions. J Biol Chem. 1994;269:32759-32767.
70. Pease EA and Tien M. Heterogeniety and regulation of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. J Bacteriol. 1992;174:3532-3540.
71. Snajdr J and Baldrian P. Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. Folia Microbiol. 2007;52(5):498-504.
72. Rodríguez E, Nuero O, Guillén F, Martínez AT and Martínez MJ. Degradation of phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. Soil Biology and Biochemistry. 2004;36:909-916.
73. Hammel KE, Tardone PT, Moen MA and Price LA. Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn III. New observations on the oxidizability of guaiacyl and syringyl substructures. Arch Biochem Biophys. 1989;270:404-409.
74. Jensen KAJr, Bao W, Kawai S, Srebotnit E and Hammel KE. Manganese-dependent cleavage of non phenolic ligninstructures by *Ceriporiopsis subvermispora* en absence of lignin peroxidase. Appl Environ Microbiol. 1996;62:3679-3686.
75. Abadulla E, Tzanov T, Robra KH, Cavaco-Paulo A and Gübitz GM. Decolourization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. Appl Environ Microbiol. 2000;66:3357-3362.
76. De Souza DF, Tychanowicz GK, de Souza CG and Peralta RM. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. J Basic Microbiol. 2006;46(2):126-133.
77. Coulibaly L, Gourene G and Agathos NS. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. African J Biotech. 2003;2(12):620-630.
78. Hirai H, Nakanishi S and Nishida T. Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. Chemosphere. 2004;55(4):641-645.
79. Cameron MD, Paice RG and Dorworth EB. Cellobiose dehydrogenase-dependent biodegradation of polyacrylate polymers by *Phanerochaete chrysosporium*. Environ. Sci Pollut Res. 2000;7:130-134.
80. Hernández D, Sánchez JE, Nieto MG and Márquez-Rocha FJ. Degradation of endosulfan during substrate preparation

and cultivation of *Pleurotus pulmonarius*. World J Microbiol Biotechnol. 2006;22(7):753-760.

81. Escobar VM, Nieto MG, Sánchez JE and Cruz L. Effect of endosulfan on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* and *Auricularia fuscosuccinea* in liquid culture. In Sánchez JE, Huerta G, Montiel E (eds) Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the fourth International Conference. Universidad Autónoma del Estado de México, Cuernavaca, México, 2002.
82. Reddy GVB, Gelpke MDS and Gold MH. Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of reductive dechlorination. J. Bacteriol. 1998;180:5159-5164.
83. Moreno GM. Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. McGraw-Hill. España, 2003.
84. Novotný Č, Rawal B, Bhatt M, Patel M, Šašek V and Molitoris HP. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. J Biotechnol. 2001;89:113-122.
85. Ling JE, Huang HY and Hickey RF. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol Bioeng. 1990;35:1125-1134.
86. González-Mesa JE. Plaguicidas: ¿Una alternativa sostenible para el medio ambiente? Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2002;33(2):82-83.