



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana**  
*Unidad Iztapalapa*

---

**Biodegradación de sustratos hidrofóbicos  
utilizando hongos filamentosos y recuperación de  
hidrofobinas**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

P R E S E N T A:

**M. en B. Juan Gabriel Vigueras Ramírez.**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev<sup>1</sup>

Co-director: Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto<sup>2</sup>

Asesor: Dra. Marcia Morales Ibarría<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-C, c/o IPH, UAM-I

<sup>2</sup> Departamento de Biotecnología, UAM-I

<sup>3</sup> Departamento de Procesos y Tecnología, UAM-C



“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, y además cuenta con apoyo del mismo consejo”.



Iztapalapa, D.F. a 10 de diciembre de 2009.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis: **“Biodegradación de sustratos hidrofóbicos utilizando hongos filamentosos y recuperación de hidrofobinas”**, que presentó: **M. en B. Juan Gabriel Viguera Ramírez.**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

Co-director: Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto

Asesor: Dra. Marcia Morales Ibarría

**Jurado:**

Presidente: Dra. Marcia Morales Ibarría

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Vocal: Dra. Patricia Larralde Corona



Muchos sueñan con alcanzar sus metas.  
Otros preferimos mantenernos despiertos  
para hacer nuestros sueños realidad.

A Dios, a mi Madre, a Juanita, a Dado





## **AGRADECIMIENTOS**

A Sergio Revah por dirigir este proyecto de investigación, por su confianza, enseñanzas, consejos, paciencia y apoyos. Lo cual ha sido fundamental para mi desarrollo personal y profesional.

A la Dra. Keiko Shirai por sus asesorías, confianza, apoyos, consejos, por la infraestructura de su laboratorio y por permitirme ser parte de su grupo.

A la Dra. Marcia Morales por sus valiosos comentarios, paciencia, apoyo y tiempo dedicado a la revisión de este documento.

A la Dra. Telma Franco por el soporte y apoyo otorgado para realizar una parte importante de este trabajo en su laboratorio.

A mi mamá Maria por darme vida, confianza, apoyo y amor incondicional.

A mi compañera de vida Juanita por estar a mi lado apoyándome en todo momento.

A mi hijo Víctor Eduardo por llegar a mi vida y ayudarme a mantenerme despierto.

A mis compañeros y amigos de la PPU4, W-107, S-157, Neith, Richi, Mony, Sergio Hernández, Dianis, Ulises, Ulises Carrasco, Carmen, Guz, Zay, Belem, Pao, Marco, Miquel, Chua, Ana, Almita, Güipis, Armando, Sonia, José, Cristal, Mary, Evelia y a los que sin querer este omitiendo. Por compartir sus conocimientos, las revisiones del inglés, apoyo técnico, su compañía, entusiasmo, paciencia, las reuniones, escaladas y demás.

A mi abue, mis tíos Margarita, Feliciano, Rosa, Celia, Juan, Paco, Luis, Genaro, Josefina, sobrinos y cuñados(as).

Al CONACyT por la beca de estudios de doctorado No. 188254 y por el financiamiento otorgado (SEP-CONACYT No. 105628). A la Unión Europea proyecto Alfa Polylyfe por el financiamiento otorgado para la estancia en la UNICAMP en Brasil. Al ICyTDF por financiar parte del viaje a The Netherlands.



# Índice general

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Biotecnología ambiental.....	1
1.2 Hongos filamentosos en la biotecnología ambiental.....	3
1.3 Biofiltros fúngicos.....	7
1.4 Hidrofobinas.....	11
1.4.1 Características bioquímicas.....	14
1.4.2 Rodlets.....	16
1.4.3 Purificación de hidrofobinas.....	17
1.4.4 Secuencias y genes .....	18
1.4.5 Actividad superficial.....	18
1.4.5 Aplicaciones de las hidrofobinas.....	21
1.4.6 Producción de hidrofobinas.....	22
<b>2. Justificación e hipótesis</b> .....	23
2.1 Justificación.....	23
2.2 Hipótesis.....	24
2.3 Objetivos.....	25
2.3.1 Objetivo general.....	25
2.3.2 Objetivos particulares.....	25
2.4 Estructura de la presentación de resultados.....	25
<b>3. Respuesta hidrofóbica del hongo <i>Rhinocladiella similis</i> en la biofiltración de compuestos orgánicos volátiles de diferente polaridad</b>	27
3.1 Resumen.....	27
3.2 Introducción.....	27

3.3 Materiales y métodos.....	29
3.4 Resultados y discusión.....	31
3.5 Conclusión.....	39
3.6 Agradecimientos.....	40
<b>4. Biofiltración de tolueno en fase gas por <i>Paecilomyces lilacinus</i> y aislamiento e identificación de una proteína hidrofobina producida en el mismo.</b>	<b>41</b>
4.1 Resumen.....	41
4.2 Introducción.....	42
4.3 Materiales y métodos.....	44
4.4 Resultados.....	49
4.5 Discusión.....	54
4.6 Agradecimientos.....	57
<b>5. Determinación de la hidrofobina PLHYD de <i>Paecilomyces lilacinus</i> al crecer con n-hexadecano en medio sólido y líquido</b>	<b>59</b>
5.1 Resumen.....	59
5.2 Introducción.....	60
5.3 Materiales y métodos.....	61
5.4 Resultados y discusión.....	64
5.5 Conclusión.....	69
5.6 Agradecimientos.....	69
<b>6. Discusión general y perspectivas.....</b>	<b>71</b>
Discusión general.....	71
Conclusión general.....	72
Perspectivas.....	73

**7. Referencias..... 75**  
**8. Anexos..... 89**



## Lista de tablas

Tabla 1.1	Compuestos contaminantes biodegradados por hongos filamentosos.	6
Tabla 1.2	Principales ventajas y desventajas de los hongos filamentosos en biofiltros.	8
Tabla 1.3	Niveles de bioseguridad de los hongos filamentosos.	11
Tabla 1.4	Diferentes moléculas biosurfactantes de origen bacteriano.	12
Tabla 1.5	Principales diferencias entre las hidrofobinas de clase I y II.	16





## Lista de figuras

Figura 1.1	Representación esquemática de la función de las hidrofobinas en la formación de micelio aéreo de los hongos filamentosos. Los monómeros de hidrofobinas excretados por el hongo se autoensamblan en la interfase, disminuyendo la tensión superficial del agua, lo que permite emerger al micelio el cual queda recubierto de las proteínas que le dan hidrofobicidad superficial y lo protegen contra la desecación.	13
Figura 1.2	Longitud de las secuencias de aminoácidos entre los residuos de cisteína en hidrofobinas clase I y II. Las X son aminoácidos diferentes de cisteína y los subíndices representan el número de aminoácidos.	15
Figura 1.3	Película polimérica muy estable, formada por pequeños gránulos cilíndricos y alargados llamados rodlets, producto de la estructura terciaria en disposición $\beta$ -plegada de hidrofobinas clase I.	17
Figura 1.4	Representación esquemática del autoensamble interfacial de las hidrofobinas. A. Sistema líquido de dos fases (aceite y agua). B. Superficie hidrofóbica (teflón). C. Superficie hidrofílica (vidrio).	19
Figura 1.5	Angulo de contacto ( $\theta$ ) de una gota de agua sobre una superficie sólida. Un valor de $\theta$ de $90^\circ$ o mayor, caracteriza a una superficie como no-mojable (hidrofóbica), y una menor de $90^\circ$ como mojable (hidrofílica).	20
Figura 3.1	Evolución de la CE de <i>R. similis</i> en biofiltros adicionados con salvado de trigo alimentados con fenol ( $\blacklozenge$ ), tolueno ( $\blacktriangle$ ) y n-hexano ( $\bullet$ ).	32
Figura 3.2	Efecto de la carga de fenol ( $\blacklozenge$ ), tolueno ( $\blacktriangle$ ) y n-hexano ( $\bullet$ ) sobre la CE de <i>R. similis</i> .	33
Figura 3.3	Efecto de la constante dieléctrica ( $\epsilon_r$ ), (---símbolos abiertos) y solubilidad (— símbolos rellenos) sobre las máximas CE de fenol ( $\blacklozenge$ ), tolueno ( $\blacktriangle$ ) y n-hexano ( $\bullet$ ) de los biofiltros empacados con perlita-salvado de trigo.	35
Figura 3.4	Evolución de la CE de <i>R. similis</i> en biofiltros con: etanol ( $\square$ ) y n-hexano ( $\circ$ ).	36

Figura 3.5	Hidrofobicidad superficial del micelio de <i>R. similis</i> obtenido por el crecimiento con etanol o n-hexano y controles abióticos (parafilm, teflón y vidrio). Las barras de error representan el error estándar. Las mismas letras significa que no existe diferencias significativas (después de ANOVA, comparación de medias por Tukey, $P < 0.05$ )	38
Figura 3.6	SDS-PAGE con gel de resolución de 15% y teñido con plata. Líneas: M, estándar de peso molecular; 1, proteínas extraídas con SDS del micelio producido en el biofiltro con vapores de etanol; 2, proteínas extraídas con SDS del micelio producido en el biofiltro con vapores de n-hexano.	39
Figura 4.1	Esquema del sistema experimental, 1 aire, 2 humidificador, 3 tolueno evaporador, 4 cámara de mezclado, 5 rotámetro, 6 entrada de aire, 7 biofiltro, 8 salida de aire, 9 puertos de muestreo.	46
Figura 4.2	Evolución de la carga (línea discontinua), CE de tolueno (círculos) y producción de CO <sub>2</sub> (triángulos) en el biofiltro inoculado con <i>P. lilacinus</i> .	50
Figura 4.3	HPLC-SEC de las proteínas precipitadas por electroburbujeo y extraídas del micelio de <i>P. lilacinus</i> obtenido en el biofiltro con vapores de tolueno. En la parte superior del cromatograma se indica el peso molecular del estándar.	51
Figura 4.4	HPLC-RP y SDS-PAGE (gel 17% teñido con plata). Línea M, estándar de peso molecular. Línea 1, hidrofobina precipitada por electroburbujeo del micelio de <i>P. lilacinus</i> producido en el biofiltro con vapores de tolueno.	52
Figura 4.5	HPLC-RP y SDS-PAGE (gel 15% teñido con azul de Coomassie). Línea M, estándar de peso molecular. Línea 1, hidrofobina PLHYD purificada del micelio de <i>P. lilacinus</i> crecido en el biofiltro con vapores de tolueno.	53
Figura 4.6	Huella peptídica obtenida por MALDI-TOF de la hidrofobina PLHYD de <i>P. lilacinus</i> . Encima de cada pico se muestran la masa y secuencia de aminoácidos.	54
Figura 5.1	Cinética de CO <sub>2</sub> producido por <i>P. lilacinus</i> al crecer con n-hexadecano en medio líquido y sólido.	64
Figura 5.2	Análisis de proteínas por HPLC-SEC y SDS-PAGE. Línea M estándar. Línea 1 medio líquido. Línea 2 medio sólido.	65

Figura 5.3.	Separación por gradiente en HPLC-RP de proteínas extraídas del micelio producido en FMS con n-hexadecano, inyectadas por triplicado.	66
Figura 5.4	HPLC-SEC de la fracción del pico P <sub>2</sub> separado por HPLC-RP. Se muestra el estándar de peso molecular y BSA utilizados para calibrar el sistema.	67
Figura 5.5	HPLC-SEC de la fracción del pico P <sub>1</sub> separado por HPLC-RP.	68



## Abreviaturas

**ANOVA** análisis de varianza

**Aw** actividad de agua

**BSA** albúmina sérica bovina

**BTEX** benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos

**CE** capacidades de eliminación

**CG** cromatografía de gases

**COV** compuestos orgánicos volátiles

**EBRT** tiempo de residencia de lecho vacío

**ER** eficiencias de remoción

**FA** ácido fórmico

**FML** fermentación en medio líquido o cultivo líquido

**FMS** fermentación en medio sólido o cultivo sólido

**HPLC-RP** fase reversa en cromatografía líquida de alta resolución

**HPLC-SEC** cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular

**HXD** n-hexadecano

**ID** diámetro interno

**MALDI-TOF** espectrometría de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz acoplada a un detector que determina el tiempo de vuelo

**NCBI** National Center for Biotechnology Information

**PLHYD** hidrofobina de *Paecilomyces lilacinus*

**PMF** identificación de proteínas por huella peptídica

**SDS** dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE** electroforesis en gel de poliacrilamida SDS

**TFA** ácido trifluoroacético

**V<sub>max</sub>** velocidad máxima



## Resumen

Los biofiltros fúngicos han mostrado altas capacidades de eliminación (CE) de compuestos orgánicos volátiles (COV) hidrofóbicos. Se ha hipotetizado que lo anterior es debido a la formación de hifas aéreas, las cuales aumentan el área de transferencia y las superficies hidrofóbicas que favorecen la partición de estos compuestos. Ambas características fisiológicas, micelio aéreo y superficies hidrofóbicas, están relacionadas con las hidrofobinas, pequeñas proteínas (~100 aminoácidos) con actividad biosurfactante, implicadas en los primeros pasos de la patogénesis fúngica que permiten la adhesión de esporas e hifas al huésped.

En este trabajo se investigó la respuesta fisiológica de los hongos filamentosos durante la biodegradación de sustratos hidrofóbicos además se analizó la posibilidad de recuperar hidrofobinas a partir de la biomasa formada. Los primeros resultados mostraron que *Rhinoctadiella similis* es capaz de biodegradar COV de polaridades opuestas en biofiltros de fase gas. Se obtuvieron CE de 74 g hexano m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> con eficiencias de remoción (ER) del 70%, y 230 g etanol m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (ER 74%). Se observó una mayor hidrofobicidad superficial al crecer en n-hexano comparado con etanol, con ángulos de contacto de 105° y 84°, respectivamente. Además la expresión de proteínas tipo hidrofobinas del micelio producido con n-hexano (15 kDa) fueron diferentes a las obtenidas en el biofiltro de etanol (8.5 kDa y 7 kDa).

Posteriormente se mostró que el nematófago *Paecilomyces lilacinus* es capaz de consumir tolueno como única fuente de carbono en un biofiltro de fase gas obteniendo una CE promedio de 50 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (ER 53%). Apartir del micelio producido en el biofiltro se purificó por electroburbujeo una hidrofobina (PLHYD) de 10.6 ± 0.3 kDa, y se identificó mediante huella peptídica (PMF). El rendimiento fue 1.1 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>. La producción de PLHYD fue evaluada también cuando creció en cultivo líquido (FML) y sólido (FMS) con n-hexadecano (HXD). El rendimiento en FMS, 0.8 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>, fue menor al obtenido en el biofiltro con tolueno, pero en FML la PLHYD no fue detectada. La actividad respiratoria en FML (V<sub>max</sub> 1.16 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) fue dos veces mayor que en FMS (V<sub>max</sub> 0.57 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>). La PLHYD mostró actividad superficial al modificar la

hidrofobicidad del teflón disminuyendo su ángulo de contacto de  $130.1 (\pm 2)^\circ$  a  $57.0 (\pm 5)^\circ$  soportando lavados con dodecil sulfato de sodio (SDS) caliente.

Siendo este un primer reporte sobre la biodegradación de sustratos hidrofóbicos con hongos filamentosos y recuperación de productos de valor agregado tal como son la hidrofobinas. El estudio además contribuye a entender más sobre la respuesta fisiológica que tienen los hongos filamentosos al crecer en ambientes hidrofóbicos. Mostrando que tanto la polaridad de los sustratos, así como el tipo de cultivo, tienen un efecto en la expresión de las proteínas del tipo hidrofobinas. También la actividad biosurfactante de las hidrofobinas puede tener un papel importante en la solubilidad y transferencia de COV, pero se necesita más trabajo al respecto.



## Abstract

Fungal biofilters have shown high elimination capacities (ECs) for hydrophobic volatile organic compounds (VOCs). It has been hypothesized that the above is due to the formation of aerial hyphae, which increase the area of transfer and hydrophobic surfaces that favor the partition of these compounds. Both physiological characteristics, aerial mycelium and hydrophobic surfaces, are related to hydrophobins, small proteins (~100 amino acids) with biosurfactant activity, which are involved in the initial stages of fungal pathogenesis allowing adherence of spores and hyphae to the host.

This study investigated the physiological response of filamentous fungi for the biodegradation of hydrophobic substrates also was analyzed the possibility of recovering hydrophobins from the formed biomass. The first results showed that *Rhinochadiella similis* was able to biodegrade VOCs of opposite polarities in gas phase biofilters. EC of 74 g hexane m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> with removal efficiencies (RE) of 70%, and 230 g ethanol m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (ER 74%) were obtained. The surface hydrophobicity was higher when grown on n-hexane than ethanol, with contact angles of 105° and 84° respectively. Furthermore the expression of hydrophobin-like proteins from the mycelium produced with n-hexane (15 kDa) were different from those obtained in the ethanol biofilter (8.5 kDa and 7 kDa).

Subsequently we showed that nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* was able to consume toluene as the sole carbon source in a gas phase biofilter found an EC of around 50 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (ER 53%). From the mycelium produced in the biofilter were purified by electrobubbling a hydrophobin (PLHYD) of 10.6 ± 0.3 kDa, and identified by peptide mass fingerprinting (PMF). Also, PLHYD production was also evaluated when grown in liquid (SmF) and solid-state fermentations (SSF) with n-hexadecane (HXD). The yield in SSF, 0.8 mg PLHYD g biomass<sup>-1</sup>, was lower than the obtained in the toluene biofilters but in SmF the PLHYD was not detected. The respiratory activity in SmF (V<sub>max</sub> 1.16 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) was two times higher than the SSF (V<sub>max</sub> 0.57 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>). The PLHYD showed surface activity to modify the hydrophobicity of Teflon from 130.1 (±2)° to 57.0 (±5)° and tolerated hot SDS washing.

This is a first report on the biodegradation of hydrophobic substrates by filamentous fungi and recovery of added value products such as hydrophobins proteins. The study also contributes to understand more about the fungal physiological response to grow in hydrophobic environments. Finding that both substrates polarity and type of culture, has an effect on expression of hydrophobins proteins. Also the biosurfactant activity of hydrophobins may have an important role in the solubility and transfer of VOC, but more work is needed in this respect.

# 1

## Introducción

### 1.1 Biotecnología ambiental

La contaminación ambiental ha alterado el equilibrio del medio ambiente provocando uno de los problemas más críticos en la actualidad, lo que ha motivado que las regulaciones medioambientales sean cada vez más estrictas. Actualmente existen diferentes tecnologías para el control y tratamiento de los contaminantes. Los procesos biotecnológicos han sido aplicados satisfactoriamente para tratar contaminantes en agua, suelo y aire. Como ejemplos podemos mencionar el tratamiento de aguas residuales para degradar la materia orgánica (coloidal y disuelta en el agua), la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos producto de los derrames de petróleo crudo y residuos de refinería, así como la eliminación de malos olores mediante la biofiltración. Estos procesos aprovechan la capacidad que tienen algunos microorganismos o plantas para degradar moléculas contaminantes con el fin de obtener energía para crecer. Una ventaja de estos procesos es que los contaminantes son transformados a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , biomasa y/o compuestos inocuos, y no sólo son transferidos a otra fase (Bolívar-Zapata, 2004; Quintero, 1981; Lema y Roca, 1998).

Los contaminantes del aire emitidos continuamente a la atmósfera por la actividad humana tienen efectos regionales y globales. Los principales contaminantes regionales de las ciudades industrializadas son las partículas suspendidas (PS), los compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles (COV y CIVs) (Lizuka y Nicod, 2000). La contaminación atmosférica puede ser originada en fuentes naturales y antropogénicas, como ejemplo de las primeras están las erupciones de volcanes emitiendo: cenizas, partículas, compuestos volátiles, dióxido de azufre,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{CH}_4$ . En cuanto a las fuentes antropogénicas se dividen en dos tipos: a) Fuentes móviles: originadas por el transporte de material o personas: automóviles, aviones, embarcaciones, camiones, ferrocarril, entre otros b) Fuentes fijas: industria: química, maderera, textil, alimentaría, procesadora de productos vegetales y animales, metalúrgica; curtidurías, tintorerías, imprentas, plantas de tratamiento de agua residual, plantas de composteo, rellenos sanitarios, entre otros (Vesilind et al. 1990). Sin embargo, muy pocas empresas se preocupan por tratar sus corrientes que emiten al aire, algunas lo hacen por la presión social, al generar malos olores, como ejemplo están las plantas de tratamiento, basureros, depósitos, plantas de alimentos, o industrias que manejan solventes. Existen tecnologías físicas o químicas para el control de emisiones gaseosas, tales como: incineración, oxidación catalítica, adsorción con carbón activo, condensación, membranas, entre otras. Generalmente, estos procesos son aplicados en corrientes con altas concentraciones del contaminante o en condiciones de presión o temperatura extremas. Sin embargo, cuando los contaminantes se encuentran en bajas concentraciones las tecnologías fisicoquímicas presentan altos costos de operación. De ahí que la biofiltración es una alternativa interesante de tratamiento por su bajo requerimiento energético, bajo impacto ambiental al no requerir condiciones extremas de operación, además los contaminantes son biodegradados y no sólo transferidos a otra fase (Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

Hasta ahora la biotecnología ambiental ha sido descrita como una tecnología para la remediación del medio ambiente aplicada en el tratamiento terminal al "final del tubo" donde las corrientes contaminadas son tratadas hasta

que puedan ser reincorporadas a la naturaleza. Sin embargo uno de los retos más interesantes de la biotecnología ambiental está en el desarrollo de tecnologías limpias para la prevención de la contaminación ambiental, aprovechando las capacidades de algunos microorganismos que biotransforman sustancias poco peligrosas en productos de diversas aplicaciones con la característica de ser compatibles con el medio ambiente al ser fácilmente reincorporados a los ciclos naturales. Como ejemplos podemos citar: a) los biopolímeros y biosurfactantes obtenidos de microorganismos, y que comienzan a remplazar a algunos productos sintéticos existentes. b) La utilización de enzimas que han permitido reducir el uso y emisión de sustancias tóxicas en procesos muy contaminantes. c) El control biológico de plagas donde se utilizan microorganismos ó sus enzimas, reduciendo o sustituyendo el uso de plaguicidas sintéticos, algunos de los cuales han resultado ser poco compatibles con el medio ambiente.

## **1.2 Hongos filamentosos en la biotecnología ambiental**

Los hongos filamentosos tienen potencial para ser aplicados en procesos de prevención y tratamiento de la contaminación. Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotas de nutrición heterotrófica. Sus hábitats son diversos, típicamente terrestres y saprófitos, pero también hay formas de agua dulce y marinas, forman un micelio ramificado para integrar redes complejas que se extienden en todas direcciones. Han sido ampliamente utilizados en procesos clásicos de producción de alimentos orientales fermentados hasta la obtención de productos de alto valor agregado, como son las enzimas y metabolitos secundarios. Son capaces de excretar grandes cantidades de enzimas a sus alrededores para degradar sustratos poliméricos (p. ej. celulosa, quitina, almidón, proteína) que sirven como nutrientes, característica que es conveniente para la producción industrial de enzimas ya que se facilitan los procesos de extracción y purificación, reduciendo tiempo y costos (Goller et al. 1998; Viniegra-González et al. 2003).

Por otro lado, se han encontrado hongos filamentosos colonizando la superficie de líquidos y sólidos contaminados. Algunos estudios han mostrado que estos

microorganismos son capaces de utilizar hidrocarburos alifáticos y aromáticos, como única fuente de carbono, lo cual puede ser aprovechado en procesos biotecnológicos para biodegradar moléculas contaminantes. La diversidad metabólica de los hongos y su capacidad para excretar enzimas les permite degradar una gran variedad de sustratos poliméricos, hidrocarburos y algunos compuestos xenobióticos. Algunos de los géneros de hongos más reportados por su capacidad para degradar hidrocarburos son: *Aspergillus* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Cladophialophora* spp., *Exophiala* spp., *Rhinoctadiella* spp. y *Fusarium* spp. (Prenafeta-Boldú et al. 2005).

Los hongos filamentosos se caracterizan por su capacidad para formar micelio aéreo, tolerar bajos valores de pH y actividad de agua, condiciones frecuentes en sistemas de FMS. Volke-Sepulveda et al. (2003) reportaron que *Aspergillus niger* cultivado sobre un soporte sólido mostró mayores tasas de degradación de HXD respecto a las obtenidas en cultivos sumergidos. Sugiriendo que la alta actividad catabólica del hongo en FMS podría estar relacionada con la presencia de las hidrofobinas, proteínas secretadas que contribuyen al desarrollo aéreo de hongos y las cuales confieren hidrofobicidad al micelio. Resultados similares fueron encontrados en biofiltros fúngicos, un sistema semejante a la FMS donde se tiene: a) un soporte sólido, al cual se adhiere el hongo, b) una fase líquida donde ocurren fenómenos de transferencia de masa y c) una fase gaseosa que en la FMS aporta solamente oxígeno, y en el caso de la biofiltración proporciona, además la fuente de carbono para los microorganismos (García-Peña, 2002).

Aunque los hongos filamentosos muestran capacidad metabólica para degradar hidrocarburos (ver tabla 1.1), el conocimiento y literatura sobre bacterias excede al de los hongos filamentosos, debido probablemente a que tradicionalmente se han empleado cultivos líquidos para llevar a cabo el aislamiento de microorganismos especializados, además de la tendencia a seleccionar bacterias por su mayor velocidad de crecimiento (Prenafeta-Boldú et al. 2005).

Por otro lado, los hongos filamentosos también pueden ser patógenos o simbioses de diversos organismos vivos, lo cual ha sido aprovechado para controlar plagas de insectos, nemátodos y hongos en cultivos vegetales. Los productores de cultivos orgánicos están a favor de este tipo de biopesticidas, debido a que representan una tecnología limpia y amigable con el medio ambiente. Los siguientes hongos destacan por ser ampliamente utilizados en formulaciones comerciales: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces farinosus*, *Lecanicillium lecanii*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* (López y Börje, 2001).

La infección del hongo se inicia con la adhesión de los conidios a la superficie hidrofóbica del huésped, proceso en el cual están implicadas unas proteínas con actividad biosurfactante llamadas hidrofobinas. Seguido a esto, se lleva a cabo la germinación del conidio y posterior degradación enzimática de la cutícula, permitiendo la penetración de las hifas al interior del huésped. Napolitano y Juárez (1997) reportan que la degradación de los hidrocarburos cuticulares de insecto, es una ruta metabólica importante para la producción de energía. Estudios posteriores con hongos entomopatógenos, utilizando medios sintéticos enriquecidos con hidrocarburos de similar longitud a los presentes en la cutícula de los insectos (n-hexadecano, n-octacosano y n-tetracosano), muestran que estos hongos, son capaces de transformar algunas estructuras de hidrocarburos en diversos productos lipídicos (ácidos grasos libres, fosfolípidos y acilglicerol), parte de los cuales pueden ser utilizados posteriormente para la producción de energía y para la biosíntesis de componentes celulares (Napolitano y Juárez 1997). Crespo et al. (2002) reportaron que al crecer a *B. bassiana* con n-hexadecano se incrementó su virulencia contra el huésped.

**Tabla 1.1** Compuestos contaminantes biodegradados por hongos filamentosos.

Compuesto	Hongo	Referencia
C <sub>2</sub> -C <sub>4</sub>	<i>Acremonium</i> spp.	Davies et al. (1973)
C <sub>6</sub> -C <sub>19</sub>	<i>Cladosporium resinae</i> ATCC 22711	Cofone et al. (1973); Lindley y Heydemann (1983)
n-hexano*	<i>Aspergillus niger</i>	Spigno et al. (2003) Spigno y De Faveri (2005)
n-hexano	<i>Fusarium solani</i> CBS 117476	Arriaga y Revah (2005 <sup>a</sup> )
n-butano	<i>Graphium</i> sp. ATCC 58400	Hardison et al. (1997)
C <sub>1</sub> -C <sub>9</sub>	<i>Scedosporium</i> spp.	Onodera et al. (1989)
n-hexadecano	<i>Trichosporon veenhuisii</i> CBS 7136	Middelhoven et al. (2000)
n-hexadecano	<i>Apergillus niger</i>	Volkpe-Sepúlveda et al. (2003)
n-hexadecano, n-tetracosano y n-octacosano	<i>Beaveria bassiana</i>	Crespo et al. (2002); Pedrini (2006)
n-hexadecano, tetradecano y undecano	<i>Fusarium solani</i> CBS 117476	Arriaga et al. (2006)
Fenol	<i>Aspergillus japonicus</i>	Milstein et al. (1983)
Fenol	<i>Penicillium</i> spp.	Scow et al. (1990); Hofrichter et al. (1993)
Fenol	<i>Trichosporon cutaneum</i>	Neujahr y Varga (1970)
Fenol, m-Cresol	<i>Trichosporon guehoae</i> CBS 8521	Middelhoven et al. (1999)
Fenol, m-Cresol	<i>Trichosporon veenhuisii</i> CBS 7136	Middelhoven et al. (2000)
p-cresol	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 28282	Jones et al. (1993)
o-cresol	<i>Penicillium frequentans</i> ATCC 96048	Hofrichter et al. (1995)
o, m, y p- Cresol	<i>Trichosporon cutaneum</i> KUY-6A	Hasegawa et al. (1990)
Bifenil y dibenzofurano	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Gesell et al. (2001, 2004)
Estireno*	<i>Exophiala jeanselmei</i> CBS 814.95	Cox et al. (1993,1996, 1997)
Estireno*	<i>Clonostachys rosea</i> CBS 102.94	Cox et al. (1993,1996)
Tolueno*	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Weber et al. (1995)
Tolueno*	<i>Exophiala lecanii-corni</i> CBS 102400	Woertz et al. (2001)
Tolueno*	<i>Exophiala oligosperma</i> CBS 113408	Woertz et al. (2001); Estévez et al. (2005)
Tolueno*	<i>Cladophialophora</i> spp.	Woertz et al. (2002)
Tolueno*	<i>Paecilomyces variotii</i> CBS 113409	Estévez et al. (2005)
Tolueno*	<i>Paecilomyces lilacinus</i> CBS 284.36	Vigueras et al. (2008)
Etilbenceno*	<i>Exophiala lecanii-corni</i>	Gunsch et al. (2007)
Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (separados y mezcla)*	<i>Paecilomyces variotii</i> CBS115145 (originalmente reportado como <i>Scedosporium apiospermum</i> )	García-Peña et al. (2001, 2005, 2008)
Formaldehído, metanol	<i>Gliocladium deliquescens</i>	Sakaguchi et al. (1975)
Formaldehído, metanol	<i>Paecilomyces variotii</i>	Sakaguchi et al. (1975)
Dietil éter	<i>Graphium</i> sp. ATCC 58400	Hardison et al. (1997)
Metil-terbutil-eter	<i>Graphium</i> sp. ATCC 58400	Hardison et al. (1997)
Mezcla de n-butil acetato, metil etil cetona, metil etil propil cetona y tolueno	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Exophiala jenselmei</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium nygamai</i>	Moe y Qi (2004)
n-hexano, tolueno, fenol y etanol (separados)*	<i>Rhinochlorella similis</i> CBS 120259 (originalmente reportado como <i>Cladosporium</i> spp.)	Arriaga et al. (2005b) Vigueras et al. (2009)
Sulfuro de hidrógeno, Dimetil disulfuro	<i>Cephalosporium</i> spp.	Ishikawa et al. (1980)

\* Compuestos biodegradados en biofiltros de fase gas



### 1.3 Biofiltros fúngicos.

La biofiltración es un proceso biológico utilizado para tratar aire contaminado que aprovecha la capacidad que tienen algunos microorganismos para transformar contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos e incorporar una fracción a nuevo material celular. El proceso consiste en hacer pasar aire o gases contaminados a través de un reactor, donde hay microorganismos (bacterias, levaduras u hongos filamentosos) que degradan los compuestos contaminantes transformándolos en compuestos más simples ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{S}^0$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2$ ) y biomasa.

Esta tecnología fue utilizada esporádicamente entre los 20's y 40's para tratar malos olores de aguas residuales. Entre los 60's y 70's aparecieron las primeras aplicaciones comerciales en los Países Bajos, Alemania y Estados Unidos. A finales de los 80's se acentuó su aplicación, además se incrementaron las investigaciones, permitiendo entender los fundamentos de los procesos (Ottengraf, 1983; van Lith, 1986; Revah y Morgan-Sagastume, 2005).

La biofiltración, es una alternativa importante para el tratamiento de aire contaminado por su bajo costo, amplio rango de aplicación y mínimo impacto ambiental, además con la ventaja de biodegradar los contaminantes y no sólo transferirlos a otra fase, como sucede con algunas tecnologías fisicoquímicas (Ottengraf, 1983; Revah y Morgan-Sagastume, 2005). Otra ventaja importante de la biofiltración respecto a las tecnologías fisicoquímicas, es el bajo costo energético, ya que los procesos biológicos se llevan a cabo a temperaturas cercanas a la ambiente y operan a presión atmosférica (Devinny et al. 1999).

Existen diferentes configuraciones de reactores para el tratamiento de aire contaminado. Entre los principales se encuentran: **a) biofiltros de lecho fijo**, el aire contaminado pasa a través del lecho empacado (orgánico o sintético), en el cual se desarrollan los microorganismos. El contaminante se transfiere a una biopelícula adherida al soporte, en donde es biodegradado por los microorganismos. La ausencia de una fase acuosa móvil lo hace el principal sistema para el tratamiento de contaminantes poco solubles en agua; **b) biofiltros de lecho escurrido**, consisten en una columna llena de un empaque inerte, sobre

el cual se desarrolla una biopelícula, con una fase líquida continua en recirculación. La actividad de la biopelícula se mantiene haciendo circular una solución rica en nutrientes sobre el soporte donde se encuentra la biopelícula adherida. El gas contaminante se absorbe en el líquido y luego es biodegradado por los microorganismos; **c) Biolavadores**, en este tipo de reactor el contaminante se transfiere a la fase acuosa en una columna empacada con un soporte inerte. Posteriormente, el líquido que contiene al contaminante es alimentado a un biorreactor de tanque agitado donde los microorganismos degradan al contaminante. Los biolavadores son adecuados para el tratamiento de compuestos muy solubles en agua. Adicionalmente se han propuestos reactores con otras configuraciones como son discos rotatorios, reactores de dos fases y biorreactores de membrana (Ottengraf, 1983, Devigny et al. 1999).

Los biofiltros son sistemas abiertos donde es frecuente la proliferación de hongos filamentosos, en consecuencia el número de cepas fúngicas aisladas de estos sistemas se ha incrementado. Algunos de los géneros aislados de biofiltros incluyen a *Cladophialophora* spp., *Cladosporium* spp., *Exophialia* spp., *Fonsecaea* spp., *Paecilomyces* spp., *Rhinocladiella* spp. (Prenafeta-Boldu et al. 2001; Kennes y Veiga 2004). La capacidad de los hongos filamentosos de tolerar condiciones ácidas, baja actividad de agua y limitación de nutrientes, les da ventaja (tabla 1.2), respecto a las bacterias, para desarrollarse en los biofiltros, ya que estas condiciones son frecuentemente encontradas en tales sistemas (Arriaga y Revah, 2005b). Además el crecimiento micelial de los hongos les permite extenderse en todas direcciones, colonizar espacios vacíos del soporte sólido y alcanzar los nutrientes disponibles.

**Tabla 1.2** Principales ventajas y desventajas de los hongos filamentosos en biofiltros.

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Diversidad metabólica	Crecimiento lento
Excreción de enzimas	Producción de esporas
Colonización de soportes sólidos	Taponamiento y caída de presión
Tolerancia a baja Aw y pH	Algunas cepas presentan riesgo
Altas CE de compuestos hidrofóbicos	biológico

En nuestro grupo de trabajo, Morales et al. (1998) observaron el crecimiento de una cepa fúngica en un biofiltro operado con vapores de tolueno. La colonización del biofiltro con dicha población predominante llevó al aislamiento y posterior identificación del hongo *Paecilomyces variotii* (Auria et al. 2000), el cual fue probado en biofiltros de 2.9 L y 8.5 L con tolueno obteniendo CE de  $200 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y ER=98% (García-Peña et al. 2001; Aizpuru et al. 2005). Estudios posteriores mostraron que *P. variotii* lleva a cabo la hidroxilación inicial del tolueno sobre el grupo metilo y a través del p-cresol (García-Peña et al. 2005). Existen un par de reportes sobre el posible uso de este hongo como agente de biocontrol. Sadek et al. (2003) reportaron que este hongo es capaz de inhibir la eclosión de huevos de nemátodos del genero *Meloidogyne* spp. Mientras Abdelzaher (2006) reporto el antagonismo sobre el fitopatógeno *Pythium spinosum*. Recientemente Nguyen et al. (2009) purificaron y caracterizaron dos quitinasas de *P. variotii* parasitando huevos de *Meloidogyne incognita*. De modo similar Arriaga y Revah, (2005b) aislaron a *Fusarium solani* y *Rhinochlorella similis* de un biofiltro que eliminaba vapores de gasolina. Posteriormente con *R. similis* realizaron experimentos sobre la biodegradación de COV de diferente polaridad (n-hexano, tolueno o fenol) en biofiltros empacados con una mezcla de perlita y salvado de trigo, el cual permitió un rápido arranque de los biofiltros y mostrando que las CE estuvieron correlacionadas con la solubilidad de los COV (resultados publicados en colaboración, ver capítulo 3).

Los procesos de tratamiento biológico de aire se basan en la transferencia de los contaminantes a una fase acuosa para su posterior biodegradación. Sin embargo, la biodegradación de compuestos hidrofóbicos está limitada, debido a su baja solubilidad lo que provoca que se encuentren poco biodisponibles para los microorganismos. Estudios en biofiltros inoculados con hongos filamentosos han mostrado altas CE de compuestos hidrofóbicos comparadas a las obtenidas con consorcios bacterianos. García-Peña et al. (2001) encontraron CE de tolueno seis veces superiores a las reportadas para bacterias usando a *P. variotii*. Con n-hexano se reportan CE entre  $100 \text{ y } 150 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  utilizando a *A. niger* (Spigno et al.

2003) y de  $90 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  con *Fusarium solani* mientras que las reportadas con bacterias están entre  $10$  y  $60 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (Arriaga y Revah 2005 a, b).

La fisiología fúngica relacionada a fenómenos de superficie tales como la formación de micelio aéreo, el cual está en contacto directo con el gas, y la hidrofobicidad superficial, favorecen la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos, en comparación a una película plana acuosa característica de las bacterias (van Groenestijn y Liu 2002; Vergara-Fernández et al. 2006, 2008). Lo cual explica en parte, las mayores CE de COV hidrofóbicos obtenidas en biofiltros fúngicos. La formación de micelio aéreo y las superficies hidrofóbicas de los hongos filamentosos son características fisiológicas que están relacionadas con unas proteínas de bajo peso molecular con actividad biosurfactante llamadas hidrofobinas.

Por otro lado, un problema que presentan los biofiltros fúngicos es el taponamiento por altas concentraciones de biomasa. Una solución ha sido limitar el suministro de nitrógeno ó potasio (Wübker et al. 1997, Aizpuru et al. 2005).

Alternativamente se ha propuesto obtener productos con valor agregado de la biomasa formada. Meza et al. (2005) reportaron un estudio interesante basado en la influencia de la adición de vapores de etanol como inductor de lacasas producidas por *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 en un biofiltro empacado con bagazo de caña. Marín (2006), evaluó la actividad quitinolítica y expresión de hidrofobinas de cepas de *Lecanicillium lecanii* en medios hidrófobos utilizando compuestos orgánicos volátiles. Arriaga et al. (2009) realizaron un estudio sobre el acoplamiento de la biodegradación aerobia de metanol con la expresión de una proteína heteróloga endoquitinasa Ech42 de *Trichoderma atroviride* en *Pichia pastoris*.

Es importante mencionar que algunos hongos aislados de biofiltros han resultado ser cepas que tienen riesgo biológico, para personas inmunocomprometidas. Por lo cual es importante que la investigación se lleve a cabo con cepas de hongos que tengan un riesgo biológico mínimo ó nulo (ver tabla 1.3).

**Tabla 1.3** Niveles de bioseguridad de los hongos filamentosos (de Hoog y Guarro, 2000)

Nivel	Efectos
H0	No patógenos.
H1	Infecciones esporádicas, superficial y no invasiva o leves.
H2	Micosis cutáneas y subcutáneas, pueden causar micosis profundas en pacientes inmunocomprometidos.
H3	Patógenos capaces de causar micosis profundas en personas sanas

## 1.4 Hidrofobinas

Como se mencionó anteriormente las altas CE de COV hidrofóbicos obtenidos en biofiltros fúngicos están relacionadas con los fenómenos de superficie de los hongos, donde están implicadas las hidrofobinas, proteínas biosurfactantes, producidas exclusivamente por hongos filamentosos. Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas producidas por microorganismos, plantas y animales. Tienen la capacidad de auto-ensamblarse en la interfase hidrofóbica-hidrofílica disminuyendo la tensión superficial, pueden dispersar burbujas de gas y/o gotas de aceite en agua (Noordman et al. 2002). La función fisiológica de los biosurfactantes microbianos aún no es totalmente conocida, pero éstos han sido encontrados en microorganismos creciendo con sustratos hidrofóbicos (Desai y Banat, 1997). Koch et al. (1991) mostraron que una mutante de *Pseudomonas aeruginosa* fue incapaz de crecer en un medio con n-hexadecano, pero el crecimiento fue restaurado al adicionar pequeñas cantidades de rhamnolípidos. De ahí, que se ha sugerido que la producción de biosurfactantes puede incrementar la biodisponibilidad y degradación de este tipo de compuestos (Bai et al. 1997; Salanitro, 2001). Los biosurfactantes se dividen en dos clases, los de alto peso molecular, que generalmente son glicolípidos y los de bajo peso molecular, que pueden ser polisacáridos, lipopolisacáridos, lipoproteínas o proteínas (Ron y Rosenberg, 2002). Los biosurfactantes más conocidos y producidos comercialmente son los rhamnolípidos (tabla 1.4), glicolípidos extraídos de *P. aeruginosa*, que por sus características y biodegradabilidad pueden usarse en

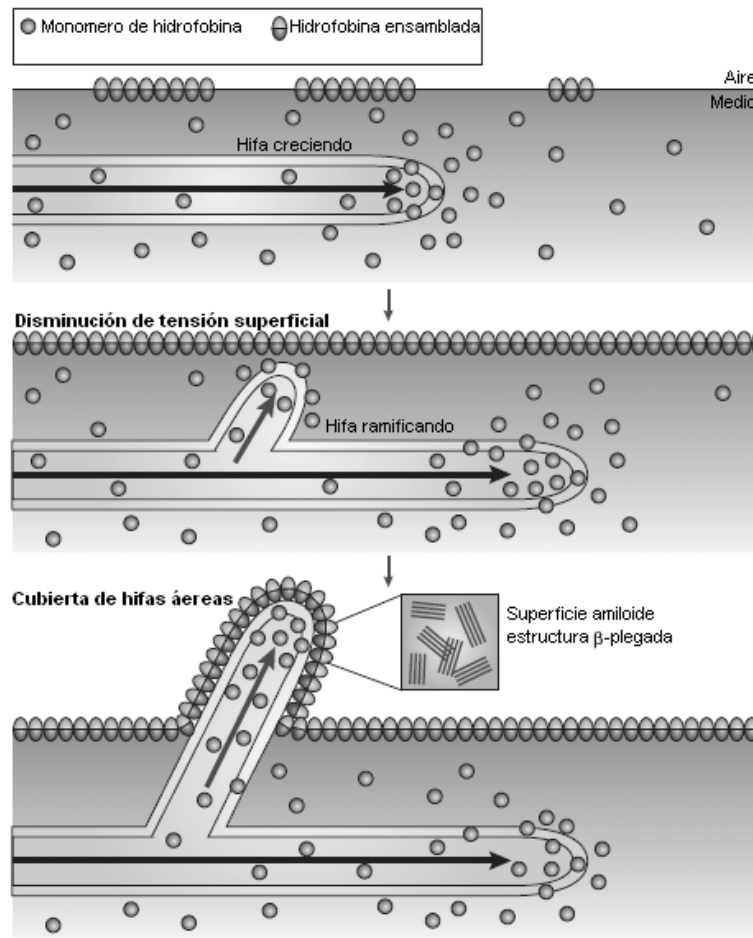
cosméticos, detergentes, shampoo, jabones, biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y plaguicidas, remoción de metales pesados entre otras aplicaciones (Desai y Banat, 1997). Algunos biosurfactantes tienen actividad antimicrobiana al solubilizar componentes de la membrana celular, por lo que podrían ser aplicados como antibióticos ó fungicidas (Ron y Rosenberg, 2002).

**Tabla 1.4** Diferentes moléculas biosurfactantes de origen bacteriano (Ron y Rosenberg, 2002)

<b>Biosurfactantes</b>	<b>Microorganismos</b>
<b>Glicolípidos</b>	
rhamnolípidos R2 C10 C10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
lípidos pentasacáridos PL	<i>Nocardia corynebacterioides</i>
rubiwettin RG1	<i>Serratia rubidaea</i>
<b>Lipopéptidos y lípoproteínas</b>	
lichensyn A	<i>Bacillus licheniformis</i>
lipopéptidos W2 y W3	<i>Serratia marcescens</i>
surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<b>Ácidos grasos</b>	
ácido graso (mezcla)	<i>Nocardia erythropolis</i>
<b>Otros</b>	
complejo-proteína-carbohidrato AP-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Un importante biosurfactante de origen fúngico son las hidrofobinas, pequeñas proteínas (~100 aminoácidos), anfipáticas, producidas exclusivamente por hongos filamentosos (ascomicetos y basidiomicetos), que presentan una distribución conservada de ocho residuos de cisteína. Las hidrofobinas tienen la capacidad de autoensamblarse en una interfase hidrofóbica e hidrofílica. Cumplen diferentes funciones durante el desarrollo de los hongos, se encuentran implicadas en el crecimiento aéreo de hongos (figura 1.1), formación canales de intercambio gaseosos, adhesión de esporas a superficies hidrofóbicas y proporcionan resistencia contra la desecación. Además tiene una función importante en los

primeros pasos de la patogénesis fúngica, permitiendo la adhesión de esporas e hifas al huésped (Wessels 1997, Wösten 2001, Scholtmeijer et al. 2001, Linder et al. 2005).



Martijn et al. 2005

**Figura 1.1** Representación esquemática de la función de las hidrofobinas en la formación de micelio aéreo de los hongos filamentosos. Los monómeros de hidrofobinas excretados por el hongo se autoensamblan en la interfase, disminuyendo la tensión superficial del agua, lo que permite emerger al micelio el cual queda recubierto de las proteínas que le dan hidrofobicidad superficial y lo protegen contra la desecación.

Las hidrofobinas han sido localizadas principalmente sobre la superficie de estructuras aéreas (hifas, cuerpos fructíferos y esporas), sin embargo en ambientes acuosos son liberadas al medio, ensamblándose en la interfase agua-aire, disminuyendo la tensión superficial y permitiendo que el hongo salga del líquido (Wessels, 1997; Wösten, 2001). Askolin et al. (2001) reportaron que el 80

% de la hidrofobina HFBI estaba unida a la pared celular del micelio y el resto se encontró en el medio de cultivo.

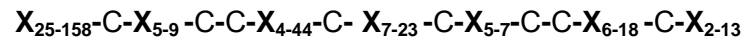
### **1.4.1 Características bioquímicas**

Originalmente se dió el nombre de hidrofobinas a estas proteínas debido su alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Wessels et al., 1991b). El peso molecular de la mayoría de las hidrofobinas es bajo (~10 kDa), sin embargo el rango reportado varía desde los 6.8 hasta 85 kDa determinado para una pentahidrofobina (Mey et al. 2003).

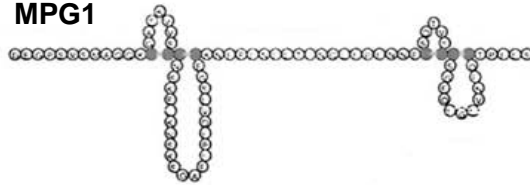
Con base en su patrón de hidropatía y solubilidad se han dividido en dos grupos, las de clase I que forman agregados insolubles en agua, requiriendo de agentes tales como ácido fórmico (AF) o ácido trifluoroacético (TFA) concentrado para extraerlas. En contraste, las hidrofobinas clase II son poco estables, y pueden ser fácilmente extraídas utilizando soluciones diluidas de SDS ó etanol (Wessels, 1997; Wösten, 2001). Ambas clases también se distinguen por sus secuencias debido a que cada clase presenta un patrón característico en el número de aminoácidos que hay entre los residuos de cisteína (ver figura 1.2). Las hidrofobinas de clase I presentan una mayor variación en el número de aminoácidos que hay entre las cisteínas en comparación a las de clase II. Además el número de aminoácidos que hay entre la tercera y cuarta cisteína es mayor en las hidrofobinas clase I. Con pocas excepciones, ambas clases de hidrofobinas tienen un patrón característico que contiene ocho residuos de cisteína, encontrando siempre de manera contigua a la segunda y tercera cisteína, así como a la sexta y séptima. Sin embargo la homología en los otros aminoácidos es baja (Wessels, 1997; Wösten y Wessels, 1997; Linder et al. 2005). Las principales diferencias entre las hidrofobinas clase I y II se muestran en la tabla 1.5.



**Hidrofobinas Clase I**



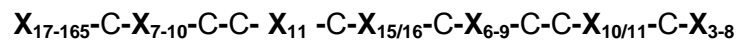
**MPG1**



**SC3**



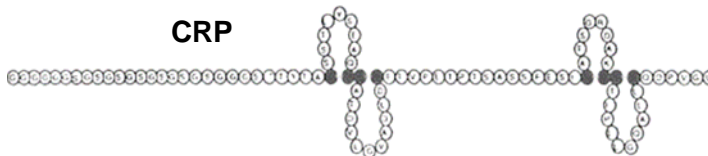
**Hidrofobinas Clase II**



**CU**



**CRP**



**Figura 1.2** Longitud de las secuencias de aminoácidos entre los residuos de cisteína en hidrofobinas clase I y II. Las X son aminoácidos diferentes de cisteína y los subíndices representan el número de aminoácidos (Wessels, 1997; Linder et al. 2005)

**Tabla 1.5** Principales diferencias entre las hidrofobinas de clase I y II.

Hidrofobinas clase I	Hidrofobinas clase II
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ascomicetos y Basidiomicetos</li><li>• Solubles en ácido fórmico y ácido trifluoroacético</li><li>• Espaciamiento entre cisteínas variable</li><li>• Secuencia de aminoácidos con baja homología</li><li>• Formación de Rodlets</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ascomicetos</li><li>• Solubles en SDS y etanol</li><li>• Espaciamiento entre cisteínas conservado</li><li>• Secuencia de aminoácidos conservada</li><li>• No forman Rodlets</li></ul>

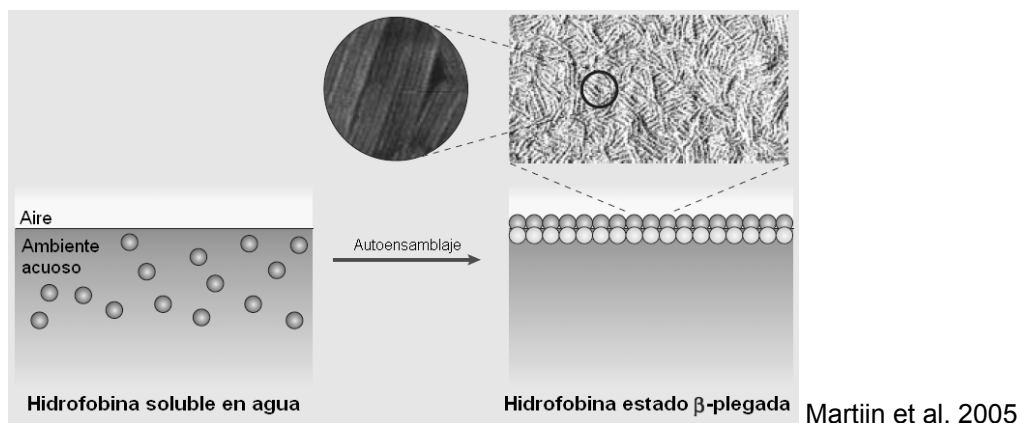
### 1.4.2 Rodlets

Las hidrofobinas clase I se caracterizan por formar estructuras de rodlets, pequeños gránulos cilíndricos y alargados (~10 nm ancho y 0.1– 0.25  $\mu\text{m}$  largo), que al unirse forman una película polimérica muy estable, capaz de resistir lavados de detergente hirviendo y soluciones de álcali. Algunos estudios muestran que los rodlets son positivos a la tinción de rojo Congo, presentando una birrefringencia (doble refracción) verde manzana, indicando que contienen una estructura terciaria en disposición  $\beta$ -plegada, por lo cual se ha sugerido que los rodlets y las fibrillas amiloides tienen estructuras similares.

La película de rodlets que se encuentra cubriendo las estructuras aéreas de los hongos, es permeable a moléculas < 200 Da lo que permite mantener canales de intercambio gaseoso, les confiere características hidrofóbicas y los protege contra la desecación (Wang et al. 2005). La eliminación de genes que codifican hidrofobinas clase I ha dado lugar a mutantes con fenotipo “fácilmente mojable”, al no formar la capa hidrofóbica de rodlets que recubren la superficie del hongo. Sin embargo no se sabe si la capa de rodlets se compone de más de un tipo de hidrofobina y/o proteína (Wessels, 1997; Wösten, 2001; Lugones et al. 1998).

Las hidrofobinas clase II también pueden autoensamblarse en la interfase hidrofílica–hidrofóbica, sin embargo no forman rodlets (Askolin et al. 2006). Sus películas son poco estables y su función en el crecimiento aéreo aún es desconocida. Se ha observado que las hidrofobinas clase II (CU CRP, HFBI y HFBI) pueden estabilizar burbujas de aire en soluciones acuosas (Carpenter et

al. 1992; Wösten y de Vocht, 2000). Se ha sugerido que la diferencia en la formación de fibrillas amiloides, entre las hidrofobinas clase I y II, se debe a que el número de aminoácidos entre la tercera y cuarta cisteína es mayor en las hidrofobinas clase I. Las hidrofobinas clase II tienen 11 residuos de aminoácidos entre estas cisteínas mientras que las clase I tienen entre 17 y 39. Sin embargo recientemente Kwan et al. (2008) mostraron que el bucle entre estas cisteínas, no es necesario para formar rodlets con la hidrofobina clase I EAS.



**Figura 1.3** Película polimérica muy estable, formada por pequeños gránulos cilíndricos y alargados llamados rodlets, producto de la estructura terciaria en disposición  $\beta$ -plegada de hidrofobinas clase I. Martijn et al. 2005

#### 1.4.3 Purificación de hidrofobinas

Existen diferentes métodos para purificar hidrofobinas. Con base en las propiedades de solubilidad de las hidrofobinas, la mayoría de los protocolos comienzan con una extracción, utilizando soluciones diluidas de SDS o etanol para liberar las hidrofobinas clase II adheridas al micelio, y/o TFA o FA concentrado para solubilizar las de clase I (Wessels et al. 1997; Wösten et al. 1994). La purificación final se realiza mediante métodos cromatográficos.

Aprovechando la capacidad que tienen las hidrofobinas para autoensamblarse en las interfases hidrofílica-hidrofóbica, se han separado hidrofobinas solubles en un medio de cultivo líquido, por la formación de espuma al aplicar vacío ó mezclar el medio con aire (Takai y Richards, 1978; Nakari-Setälä et al. 1997). De forma similar Lugones et al. (1998) y Sarlin et al. (2005) aplicaron el electroburbujeo para precipitar y aislar hidrofobinas producidas en cultivo sumergido. También se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC-SEC y HPLC-RP) para purificar estas proteínas entre la que destaca la de fase reversa, la cual permite separar proteínas hidrofóbicas (Carpenter et al. 1992; Nakari-Setälä et al. 1996; Tagu et al. 2000).

### **1.4.4 Secuencias y genes**

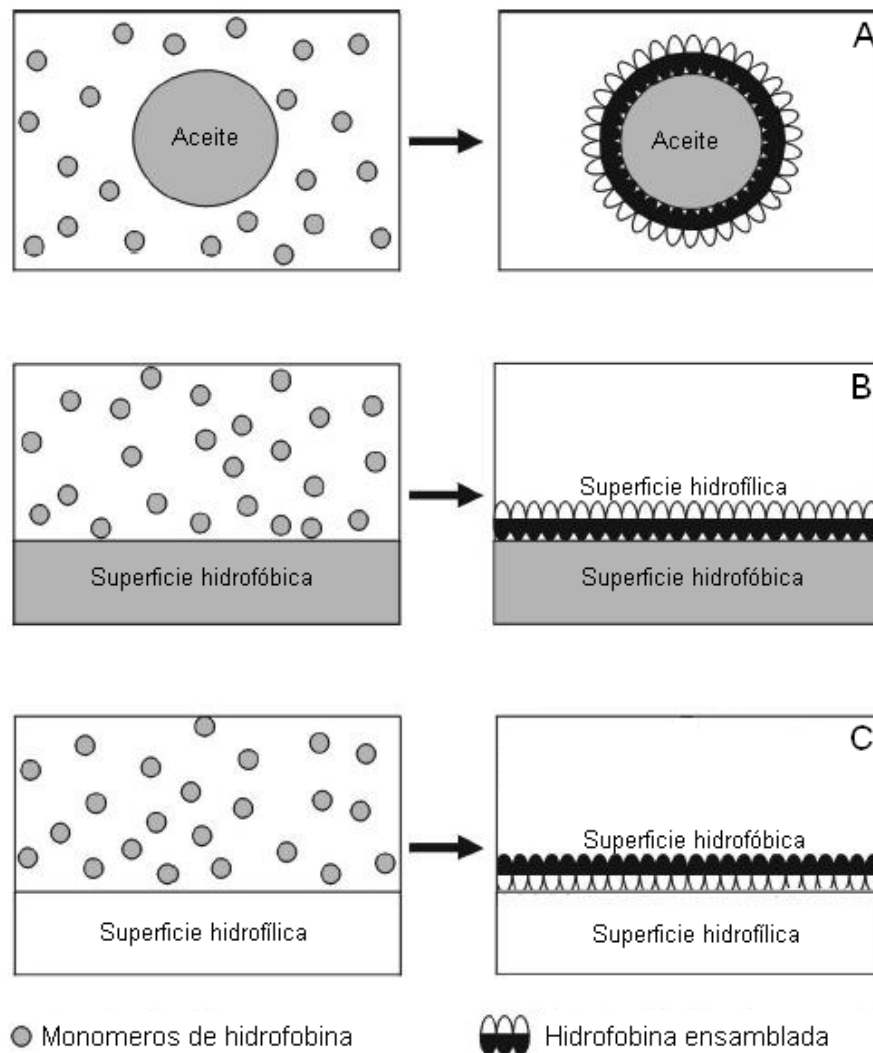
Los primeros genes de hidrofobinas fueron descubiertos en *Schizophyllum commune*. A la fecha, más de 70 secuencias de hidrofobinas han sido reportadas. La SC3 de *S. commune*, y las HFBI y HFBII de *Trichoderma reesei* son las hidrofobinas más estudiadas (Linder et al. 2005). La expresión de los genes que codifican hidrofobinas puede ser muy fuerte. Por ejemplo, el gen que codifica ABH1 (HYPA) produce el 60% del ARNm total (de Groot et al. 1996), y el gen de CRP produce el 25% del ARNm total de *Cryphonectria parasitica* durante la fase de crecimiento (Zhang et al. 1994). Una misma especie de hongo puede tener múltiples genes codificando para diferentes tipos de hidrofobinas.

Las hidrofobinas clase I han sido encontradas en ascomicetos y basidiomicetos, mientras las clase II solo han sido observadas en ascomicetos. *S. commune* expresa al menos cuatro diferentes hidrofobinas de clase I. En *T. reesei* se han encontrado tres hidrofobinas de clase II. Algunos de los hongos que contienen ambas clases de hidrofobinas son: el patógeno de tomate *Cladosporium fulvum* que tiene cuatro hidrofobinas clase I y dos clase II. El patógeno de maíz *Fusarium verticillioides* tiene tres genes codificando para hidrofobinas clase I y dos para clase II. Y el patógeno de arroz *Magnaporthe grisea* contiene al menos una hidrofobina clase I y una de clase II (Askolin et al. 2006).

### **1.4.5 Actividad superficial**

La propiedad característica de las hidrofobinas es el autoensamble interfacial. En líquidos, ambas clases de hidrofobinas son capaces de disminuir la tensión superficial del agua, y estabilizar gotas de aceite en agua, lo cual indica que estas proteínas migran a la interfase hidrofílica-hidrofóbica (Wösten et al. 1999; Wösten y de Vocht, 2000; Wang et al. 2005). Sobre sólidos, una película de hidrofobinas permite cambiar la hidrofobicidad de la superficie, convirtiéndola de hidrofílica a

hidrofóbica, y viceversa (ver figura 1.4) (Wösten et al. 1994; Wösten y Wessels, 1997; Scholtmeijer et al. 2001).

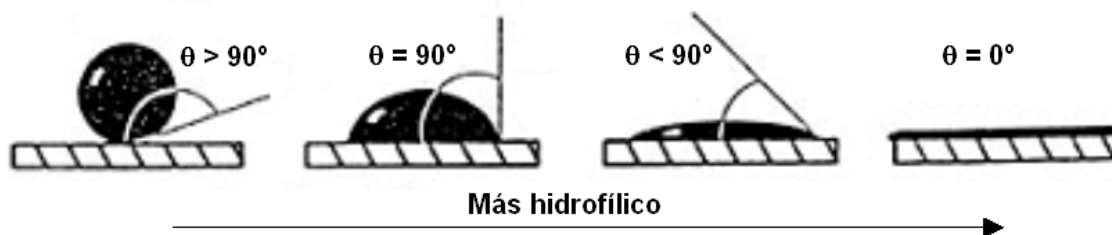


Scholtmeijer et al. 2001.

**Figura 1.4** Representación esquemática del autoensamble interfacial de las hidrofobinas. A, Sistema líquido de dos fases (aceite y agua). B, Superficie hidrofóbica (teflón). C, Superficie hidrofílica (Vidrio).

La humectabilidad es la interacción intermolecular entre un líquido y una superficie sólida, y se determina mediante la medición del ángulo de contacto ( $\theta$ ) de una gota de agua colocada sobre la superficie de un sólido. Un ángulo de contacto de  $90^\circ$  o mayor, caracteriza a una superficie como hidrofóbica, y un ángulo menor de  $90^\circ$ , como hidrofílica. Un ángulo de contacto de  $0^\circ$  indica

completa humectabilidad. Existen superficies llamadas superhidrofóbicas que tienen ángulos de contactos mayores a  $150^\circ$ , casi no muestran contacto entre la gota de líquido y la superficie sólida (de Gennes 1985).



**Figura 1.5** Ángulo de contacto ( $\theta$ ) de una gota de agua sobre una superficie sólida. Un valor de  $\theta$  de  $90^\circ$  o mayor, caracteriza a una superficie como hidrofóbica, y una menor de  $90^\circ$  como hidrofílica (de Gennes 1985).

Algunos estudios con hidrofobinas clase I purificadas, muestran la formación de películas de rodlets sobre soportes sólidos. El mosaico de rodlets puede ser observado por microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica. (Wösten et al. 1994; Wessels, 1997; de Vocht et al. 1998, 2000; Lugones et al. 1998). Algunas hidrofobinas como POH2 y Vmh3 de *Pleurotus ostreatus* se encuentran glicosiladas (Ásgeirsdóttir et al. 1998; Peñas et al. 2002). de Vocht et al. (1998) mostraron que la glicosilación de la hidrofobina SC3, incrementa la capacidad de hacer hidrofílico al teflón. Las hidrofobinas clase II también muestran la formación de estructuras cristalinas altamente ordenadas en la interfase agua-aire, y alrededor de burbujas de aire en soluciones acuosas (Serimaa et al. 2003; Paananen et al. 2003).

#### **1.4.6 Aplicaciones de las hidrofobinas**

La capacidad que tienen las hidrofobinas para autoensamblarse en las interfases hidrofílica-hidrofóbica, da lugar a varias aplicaciones potenciales. Las hidrofobinas tienen la ventaja de ser biodegradables además de no mostrar toxicidad, citotoxicidad o inmunogenicidad, ya que normalmente son ingeridas por humanos en las setas o alimentos que provienen de las fermentaciones donde se emplean hongos (Scholtmeijer y Wessels, 2001; Askolin et al. 2001; Wösten 2001). La

actividad superficial de las hidrofobinas en sistemas líquidos puede compararse con los surfactantes sintéticos y otros biosurfactantes comerciales. Por lo que pueden emplearse como agentes emulsificantes para suspender soluciones oleosas para la administración de fármacos ó como espumantes en diferentes ramas de la industria (Lumsdon et al. 2005). Aprovechando la característica de las hidrofobinas para cambiar las propiedades biofísicas de una superficie, han sido empleadas en la adhesión de moléculas a superficies por las que normalmente no tienen afinidad, p. ej. inmovilización de células, moléculas, proteínas, anticuerpos a superficies por las cuales no tienen afinidad, lo cual puede ser aplicado en biosensores o en nanotecnología. Utilizando la hidrofobina SC3 se han recubierto las superficies de electrodos para inmovilizar enzimas redox (Corvis et al. 2005). De manera similar se han inmovilizado compuestos electroactivos sobre electrodos cubiertos con la hidrofobina HYDPT-1 de *Pisolithus tinctorius* (Bilewicz et al. 2001). La hidrofobina HFBI de *T. reesei* ha sido utilizada para inmovilizar endoglucanasas sobre vidrio silanizado y teflón (Linder et al. 2002). Utilizando esta misma hidrofobina, Nakari-Setälä et al. (2002) unieron células de *Saccharomyces cerevisiae* a un material hidrofóbico de silicón. Palomo et al. (2003) inmovilizaron lipasas sobre agarosa hidrofílica utilizando hidrofobinas de *P. ostreatus* como un absorbente. La biocompatibilidad de las hidrofobinas permite su uso en aplicaciones médicas. Estudios muestran el incrementó del crecimiento de fibroplastos sobre teflón recubierto con hidrofobinas SC3 ó SC4 (Janssen et al. 2004; Scholtmeijer et al. 2001). La hidrofobina HFBI se ha utilizado en la purificación de proteínas, tal como la separación de endoglucanasa EGI en un sistema de dos fases en escala piloto (Selber et al. 2004). Así como en la purificación de proteínas recombinantes de células de insectos en un solo paso (Lahtinen et al. 2008). El efecto gushing en la cerveza, se produce cuando la cebada está contaminada con hongos, encontrando que las hidrofobinas son un factor importante lo que ha llevado a la elaboración de un inmunoensayo, donde las hidrofobinas sirven como un indicador (Kleemola et al. 2001; Linder et al. 2005). Desde el primer reporte donde se utiliza el término hidrofobina, hasta el momento se han encontrado diversas aplicaciones para estas proteínas, lo que se

ve reflejado en el número de patentes (176 registradas en [freepatentsonline.com](http://freepatentsonline.com)) donde se utilizan estas proteínas, por lo que es importante continuar su estudio.

### **1.4.7 Producción de hidrofobinas**

Aunque algunas hidrofobinas han sido ampliamente estudiadas, las investigaciones se han centrado en los aspectos biológicos de las proteínas y no en su producción. En lo que respecta a la producción de estas proteínas, los hongos filamentosos son los microorganismos que las producen naturalmente y las cantidades producidas están en el orden de  $\text{mg L}^{-1}$ , obtenidas con cepas fúngicas silvestres lo cual es adecuado para aplicaciones a pequeña escala, como dispositivos médicos, biosensores, entre otros, ya que 1 mg de hidrofobina clase I es suficiente para cubrir 1  $\text{m}^2$  de teflón (Askolin et al. 2001). Sin embargo, algunas aplicaciones a mayor escala pueden requerir mayores cantidades de hidrofobina ( $\text{g L}^{-1}$ ). Por lo cual se han realizado intentos para producir hidrofobinas en las bacterias *Escherichia coli* y *Hansenula polymorpha* obteniendo resultados poco satisfactorios al producirlas en muy bajas cantidades ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Scholtmeijer et al. 2001; Askolin et al. 2001). Sin embargo, recientemente la empresa BASF ha logrado incrementar la producción, al transferir el gen de una hidrofobina del hongo *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) a *E. coli* produciendo kilogramos a escala planta piloto en reactores de tanque agitado. Lo cual fue logrado a través de la modulación de la expresión de genes y generando proteínas de fusión, proteínas quiméricas, que son creadas uniendo dos o más genes, en este caso fusionaron la hidrofobina clase I DewA y parte de la proteína yaaD de *Bacillus subtilis*, siendo la primera empresa en producir hidrofobinas a escala industrial (Wohlleben et al. 2009). Actualmente la hidrofobina SC3 de *S. commune* se encuentra disponible en Sigma Aldrich (No. producto 68795).



# 2

## Justificación e hipótesis

### 2.1 Justificación

Como pudo verse en el desarrollo de la sección anterior, diversas investigaciones muestran el potencial de los hongos filamentosos para biodegradar hidrocarburos (tabla 1.1). Algunos trabajos han obtenido altas tasas en la eliminación de sustratos hidrofóbicos utilizando hongos filamentosos en medio sólido ó biofiltros, mencionando que las hidrofobinas, proteínas con actividad biosurfactante, podrían estar implicadas en estos procesos. Sin embargo hasta el momento el uso de hongos filamentosos en biofiltros solo ha sido a escala laboratorio y no hay estudios sobre hidrofobinas aisladas del micelio de hongos producidos en estos sistemas. Las precauciones en el uso extensivo de los biofiltros fúngicos se debe, en parte, a que algunas cepas tienen cierto grado de riesgo biológico ya sea para plantas, animales o humanos.

A pesar de lo anterior existen en la naturaleza existen hongos filamentosos que han sido utilizados satisfactoriamente en procesos para la prevención de la contaminación, p. ej. biocontrol de plagas, producción de enzimas, moléculas biosurfactantes, entre otros. Los cuales tienen la principal ventaja de ser amigables con el medio ambiente durante su uso o producción. De esta manera, resulta importante realizar estudios sobre la biodegradación de contaminantes, utilizando cepas fúngicas de las cuales se pueda recuperar algún subproducto de

## Capítulo 2

interés, p. ej. biomasa, esporas o biomoléculas dando un valor agregado a un proceso de tratamiento para la eliminación de contaminantes.

De ahí que este trabajo se enfoque en la investigación de la biodegradación de sustratos hidrofóbicos utilizando hongos filamentosos, y explora la posibilidad de obtener simultáneamente proteínas de alto valor, como son las hidrofobinas. Por otro lado, se ha mencionado la posible importancia de estas proteínas en la biodegradación de sustratos hidrofóbicos, sin embargo hasta el momento no hay estudios sobre hidrofobinas aisladas del micelio de hongos producidos en estos sistemas, por lo que este estudio es un primer paso en ese sentido.

### **2.2 Hipótesis**

La respuesta fisiológica de los hongos filamentosos al crecer en un ambiente hidrofóbico puede diferir respecto a un ambiente hidrofílico, por lo tanto la polaridad de los sustratos y el tipo de cultivo, tendrán un efecto en la hidrofobicidad superficial del hongo y las proteínas del tipo hidrofobinas producidas.

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 Objetivo general

Contribuir al entendimiento de la respuesta fisiológica de los hongos filamentosos al crecer en ambientes hidrofóbicos. Así como evaluar la posible recuperación de productos de valor agregado, como son las hidrofobinas, a partir de la biomasa producida durante la biodegradación de sustratos hidrofóbicos.

### 2.3.2 Objetivos particulares

Determinar la expresión de las proteínas tipo hidrofobinas extraídas del micelio producido en biofiltros con COV de diferente polaridad.

Medir el crecimiento del hongo nematófago *P. lilacinus* con un sustrato gaseoso hidrofóbico en un biofiltro, así como caracterizar una hidrofobina clase I.

Estudiar el efecto del ambiente y tipo de cultivo, sólido y líquido, sobre la expresión de hidrofobinas utilizando n-hexadecano como sustrato hidrofóbico

## 2.4 Estructura de la presentación de resultados

Los resultados obtenidos se presentan en tres capítulos, cada uno de los cuales está directamente relacionados con los objetivos planteados anteriormente.

El capítulo 3 muestra la investigación realizada sobre la respuesta hidrofóbica del hongo *R. similis* en la biofiltración de COV de polaridades extremas (n-hexano o etanol). Esta cepa fue originalmente aislada de un biofiltro que eliminaba vapores de gasolina y reportada inicialmente como *Cladosporium* sp. (Arriaga y Revah, 2005b). Existen reportes de un *C. fulvum* que tiene cuatro hidrofobinas clase I y dos clase II por lo cual se consideró a la cepa *Cladosporium* sp. un interesante candidato de estudio. Sin embargo posteriormente fue

## Capítulo 2

identificada como *R. similis*, especie clasificada con un nivel de bioseguridad H2, por lo que a pesar de haber obtenido resultados satisfactorios en cuanto a la biodegradación de los COV, se decidió cambiar de cepa para continuar los estudios.

En el capítulo 4 se determinó la biodegradación de tolueno en un biofiltro utilizando a *P. lilacinus* y se caracterizó una hidrofobina clase I. Este hongo fue observado por primera vez en asociación con huevos de nemátodos por Lysek en 1976 (Stirling, 1991), y ha sido ampliamente estudiado y utilizado en el control biológico de nemátodos fitopatógenos, presentando un nivel de bioseguridad H1 (Atkins et al. 2005; de Hoog y Guarro, 2000). Por otro lado hay reportes sobre la metabolización de los hidrocarburos aromáticos bifenil y dibenzofurano utilizando a *P. lilacinus* (Gesell et al. 2001, 2004). Sin embargo no existen reportes en biofiltros de fase gas por lo cual decidimos trabajar con este hongo.

Finalmente en el capítulo 5 se evaluó la producción de la hidrofobina de *P. lilacinus* al crecer con HXD en medio sólido y líquido. Este hidrocarburo permite una rápida producción de biomasa en comparación con tolueno, y se encuentra presente en la cutícula de nemátodos. Además es comúnmente utilizado como compuesto modelo en estudios de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos. Por otro lado las hidrofobinas están implicadas en los primeros pasos de la patogénesis fúngica, al permitir la adhesión de esporas e hifas a la cutícula cerosa del huésped (Wessels 1997, Wösten 2001, Scholtmeijer et al. 2001, Linder et al. 2005).

# 3

## **Respuesta hidrofóbica del hongo *Rhinochadiella similis* en la biofiltración de compuestos orgánicos volátiles de diferente polaridad**

*Capítulo publicado en Biotechnology Letters (2009) 31:1203–1209*

*Gabriel Viguera, Sonia Arriaga, Keiko Shirai, Marcia Morales, Sergio Revah*

*Nota de colaboración: Los resultados de las CE, efecto de la carga y constante dieléctrica obtenidos en los biofiltros empacados con perlita-salvado de trigo fueron realizados por Sonia Arriaga*

### **3.1 Resumen**

*Rhinochadiella similis* fue capaz de biodegradar COV de diferente polaridad en biofiltros fase gas. Obteniendo CE de 74 g hexano m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, 230 g etanol m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, 85 g tolueno m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> y 30 g fenol m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>. Los valores de las CE estuvieron correlacionadas con la solubilidad de los COV. El crecimiento de *R. similis* con n-hexano o etanol en biofiltros empacados con perlita mostró una mayor hidrofobicidad superficial en n-hexano comparado con etanol. Las proteínas tipo hidrofobinas extraídas del micelio producido con n-hexano (15 kDa) fueron diferentes de las obtenidas en el biofiltro de etanol (8.5 kDa y 7 kDa).

### **3.2 Introducción**

La biofiltración es una tecnología efectiva para el tratamiento de malos olores y COV. Los biofiltros son sistemas abiertos donde el crecimiento de hongos filamentosos se ha encontrado consistentemente. Cepas fúngicas de diferentes

géneros, incluyendo *Paecilomyces* spp., *Exophialia* spp., *Cladosporium* spp., entre otros han sido aisladas y probadas satisfactoriamente en biofiltros (Prenafeta-Boldu et al. 2001; Kennes y Veiga 2004). Los hongos son conocidos por su diversidad genética y enzimática así como por su capacidad para crecer bajo condiciones ambientales de estrés tales como baja disponibilidad de nutrientes, baja  $A_w$  y bajos valores de pH, donde el crecimiento bacteriano puede estar limitado (Arriaga y Revah, 2005b), muchas de estas condiciones son encontradas frecuentemente en los biofiltros. En trabajos previos sobre la remoción de n-hexano, se aislaron dos hongos, los cuales fueron posteriormente clasificados como *F. solani* y *R. similis*. Después *F. solani* fue inoculado solo en un biofiltro, obteniendo altas CE, ( $CE > 150 \text{ g hexano m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ), (Arriaga y Revah 2005a; Vergara-Fernández et al. 2008). Los biofiltros fúngicos muestran altas CE de COV hidrofóbicos debido a que los hongos forman hifas aéreas, lo cual favorece la transferencia, y la hidrofobicidad superficial que incrementa la partición de estos compuestos (van Groenestijn y Liu 2002; Vergara-Fernández et al. 2006).

El crecimiento aéreo y la hidrofobicidad superficial está estrechamente relacionada con las hidrofobinas, pequeñas proteínas (~10 kDa) con actividad biosurfactante, capaces de autoensamblarse en una interfase hidrofílica-hidrofóbica, las cuales tienen como función proteger de la humedad y evitar una excesiva evaporación de agua citoplasmática de las estructuras aéreas del hongo. En base a su patrón de hidropatía se han dividido en dos grupos, las de clase I son más hidrofóbicas, y sólo pueden ser solubilizadas en ácidos fuertes tales como FA o TFA, mientras las clase II pueden ser extraídas con soluciones diluidas de SDS etanol (Wessels, 1997; Wösten, 2001). Hasta ahora, estas proteínas se han encontrado en todos los hongos filamentosos, y algunos contienen más de un gen codificando para hidrofobinas (Wösten, 2001). Las más estudiadas son la SC3 de *S. commune*, y las HFBI y HFBI de *T. reesei* (Linder et al. 2005). Viguera et al. (2008) aislaron la hidrofobina PLHYD de *P. lilacinus* producido en un biofiltro fase gas utilizando tolueno como única fuente de carbono.

El objetivo de este estudio fue investigar la degradación de COV de diferente polaridad en biofiltros con *R. similis*, evaluando los cambios en su

hidrofobicidad superficial y la presencia de proteínas tipo hidrofobinas cuando crece sobre perlita en biofiltros con vapores de n-hexano ó etanol.

### 3.3 Materiales y métodos

#### Cepa fúngica

*R. similis* CBS 120259, originalmente reportado como *Cladosporium* sp., fue aislado de un biofiltro que eliminaba vapores de gasolina (Arriaga y Revah, 2005b). Esta cepa fue propagada sobre agar papa dextrosa a 28°C y mantenida a 4°C.

#### Sistemas de biofiltración

Todos los experimentos fueron a 30°C usando tubos cilíndricos de vidrio de 0.230 L. Para los experimentos de degradación, los biofiltros fueron empacados con una mezcla de 20.6 g de perlita y 4.1 g de salvado de trigo (Nutrisa México, DF), estéril e impregnada con medio mineral, reportado previamente por Arriaga y Revah (2005a), conteniendo  $2 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Una corriente de fenol, tolueno o n-hexano fue mezclada con aire húmedo y pasada a través del biofiltro a una velocidad de flujo de  $200 \text{ mL min}^{-1}$ , correspondiente a un tiempo de residencia del lecho vacío, EBRT, de 1.1 min. Las concentraciones de tolueno y n-hexano fueron  $3 \pm 0.5 \text{ g m}^{-3}$ . El fenol fue mantenido en un baño de agua a 45°C y la concentración a la entrada fue  $0.5 \text{ g m}^{-3}$ . Se llevaron a cabo una serie final de experimentos para evaluar la influencia de la carga sobre la CE en los biorreactores variando la concentración de gas a la entrada entre  $0.2\text{-}10 \text{ g m}^{-3}$  con un EBRT constante.

Experimentos de biofiltración con vapores de n-hexano (hidrofóbico) o etanol (hidrofílico) pero sin salvado de trigo fueron también realizados para evaluar la biomasa final y aislar las hidrofobinas. Una corriente de vapores de n-hexano o etanol fueron pasados a través del biofiltro a una velocidad de flujo de  $100 \text{ mL min}^{-1}$  (EBRT = 1.7 min). Las concentraciones de n-hexano y etanol a la entrada fueron  $5 \pm 0.5 \text{ g m}^{-3}$ , correspondiendo a una carga de  $168 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y  $274 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$

respectivamente. Todos los experimentos fueron independientemente probados para cada hidrocarburo por duplicado. Los hidrocarburos fueron monitoreados por cromatografía de gases (CG) en las corrientes de entrada y salida del biofiltro. Los datos obtenidos en los experimentos de biofiltración fueron expresados como carga a la entrada ( $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$ ), CE del biofiltro ( $\text{g m}^{-3} \text{h}^{-1}$ ) y ER (%) (Arriaga y Revah 2005a).

### **Hidrofobicidad superficial sobre micelio**

La hidrofobicidad superficial de *R. similis* crecida con vapores de n-hexano o etanol fue determinada por la medición del ángulo de contacto de una gota de agua (1  $\mu\text{L}$ ) sobre el micelio con un microscopio de luz horizontal Intel Qx3 (Intel Corporation) como reportaron Vergara-Fernández et al. 2006. Membranas hidrofílicas (MF, Millipore, 0.45  $\mu\text{m}$ , 47 mm diámetro) fueron utilizadas y todas las muestras fueron incubadas bajo condiciones estáticas a 30°C por 20 días. El ángulo de contacto fue medido en las fotos digitales con el programa ImageJ1.37v (National Institutes of Health, USA) para análisis de imágenes. Los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado. Las mediciones fueron realizadas por cuadruplicado en seis diferentes puntos de cada muestra. Los datos experimentales fueron analizados con una ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey Kramer para la comparación múltiple de medias con el programa NCSS 2001.

### **Extracción de proteínas tipo hidrofobinas**

Apartir del micelio producido en los biofiltros de n-hexano y etanol se extrajeron las proteínas relacionadas con hidrofobinas basándose en la disolución de los ensambles de hidrofobinas clase II utilizando SDS diluido de acuerdo al procedimiento reportado por Askolin et al. 2001. Las proteínas fueron extraídas con una solución de SDS al 2% en buffer 100mM Tris-HCl, pH 9.0, durante 2 h a temperatura ambiente; seguido por una centrifugación a 7,740 x g y 4°C por 10 min. Los sobrenadantes fueron dializados y liofilizados. La proteína total fue determinada por el método de Bradford (1976).



### **Análisis de proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Los perfiles de las proteínas fueron analizados en base a la masa molecular por SDS-PAGE utilizando la técnica de Laemmli (1970) sobre un gel de estancamiento del 4% y un gel de resolviendo al 15% a 150V. Los geles fueron visualizados con tinción de plata (Bio-Rad). Las bandas de las proteínas fueron adquiridas con un Gel-Doc 100 (Bio-Rad) y analizado con un programa para el procesamiento de imágenes (PQQuest Basic 8.0.1, Bio-Rad), utilizando un estándar de proteínas de amplio rango (Bio-Rad).

### **Métodos analíticos**

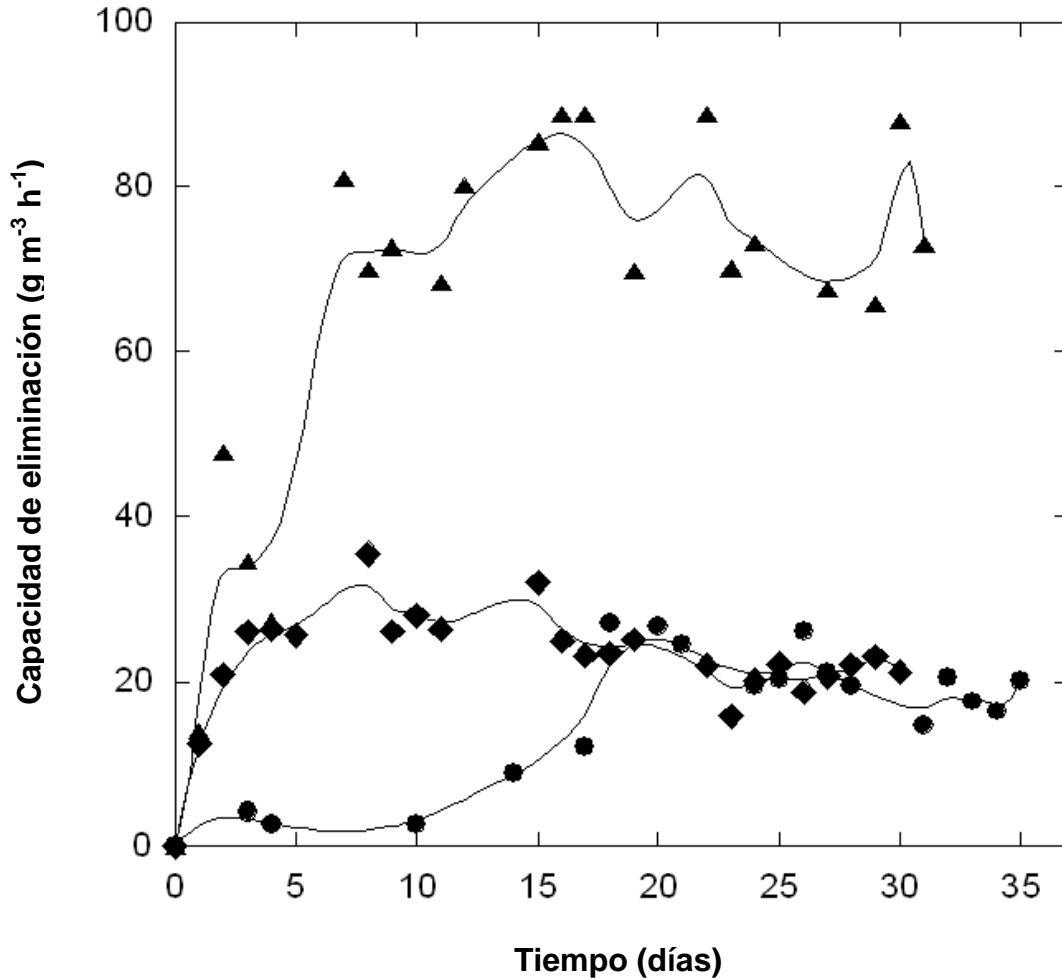
Las concentraciones de COV fueron determinadas en las muestras de gas de los biofiltros por cromatografía de gases con detector de ionización de flama, de acuerdo a Arriaga y Revah (2005a). La biomasa fue medida como sólidos volátiles con un analizador termogravimétrico de acuerdo a Arriaga y Revah (2005b). Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado.

## **3.4 Resultados y discusiones**

### **Biofiltración de COV de diferente polaridad con *Rhinochadiella similis***

La figura 3.1 muestra la evolución del consumo de hidrocarburos gaseosos en biofiltros empacados con una mezcla de perlita y salvado de trigo, el cual permitió un rápido crecimiento y consumo de hidrocarburos durante los primeros días de operación de los biofiltros.

Las CE se incrementaron gradualmente hasta alcanzar valores de 85 g tolueno m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (ER 50%), 30 g fenol m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (ER 70%) y 30 g hexano m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (ER 15%).



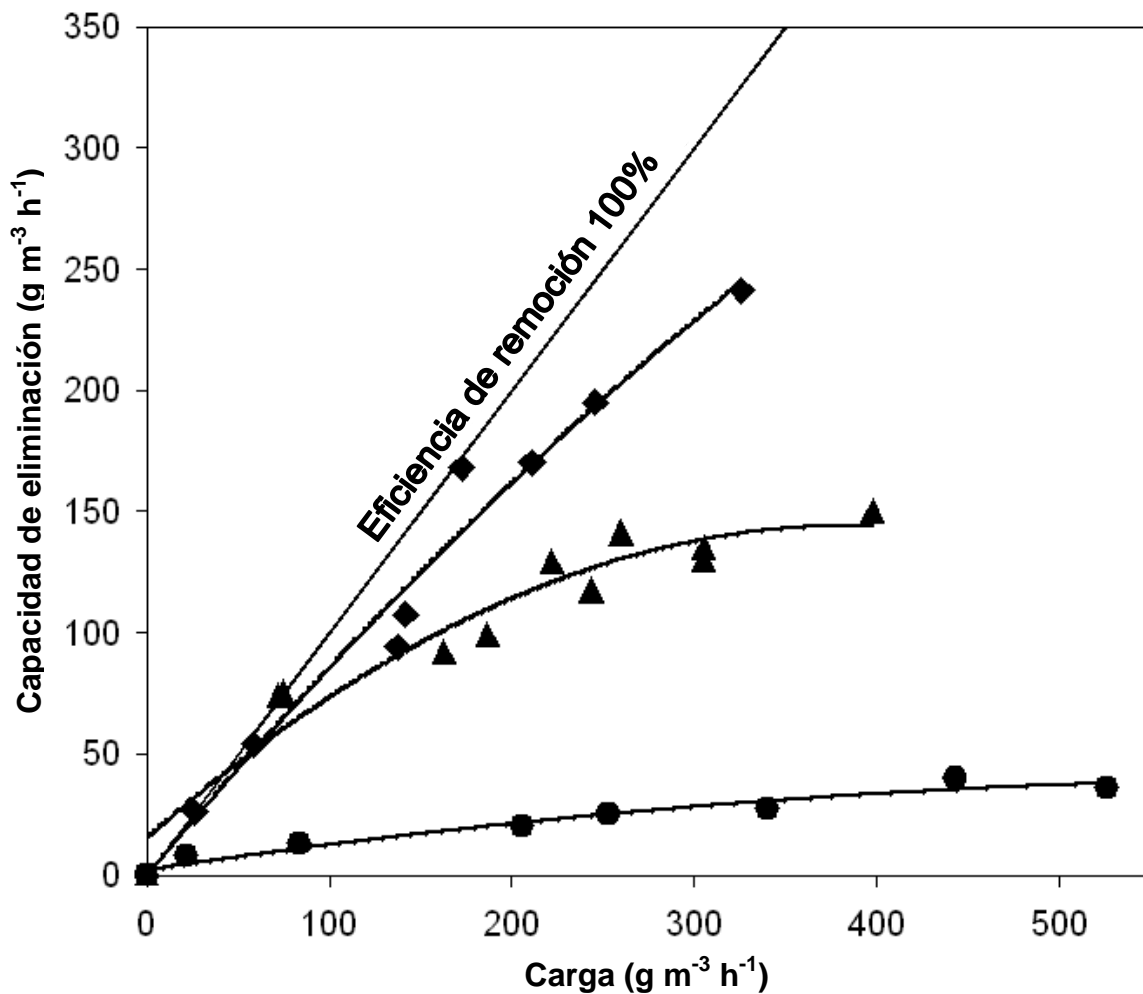
**Figura 3.1** Evolución de la CE de *R. similis* en biofiltros adicionados con salvado de trigo alimentados con fenol (◆), tolueno (▲) y n-hexano (●).

**Efecto de la carga de hidrocarburo sobre el desempeño del biorreactor.**

Diferentes cargas fueron aplicadas a los biofiltros para obtener la máxima CE de fenol, tolueno y n-hexano. Los perfiles son mostrados en la figura 3.2 donde para la biodegradación de fenol, fue obtenida una CE de  $250 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (ER ~90%) para una carga de  $325 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . La CE fue similar al valor de  $250 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  reportado por Zilli et al. (1993) en fase gas por *Pseudomonas putida* así como al valor de  $270 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  reportado por Ryabkin et al. (2001) para la misma carga aplicada ( $\sim 300 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). En este trabajo, no fue posible obtener la máxima CE de fenol para las cargas aplicadas por la dificultad para alcanzar elevadas concentraciones

de fenol a 45°C para el flujo aplicado. La máxima CE de tolueno fue  $150 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  para cargas mayores que  $350 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , este valor de CE es menor que el reportado por Aizpuru et al. (2005) de  $245 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  con una carga  $\sim 300 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  con *P. variotii* CBS 115145.

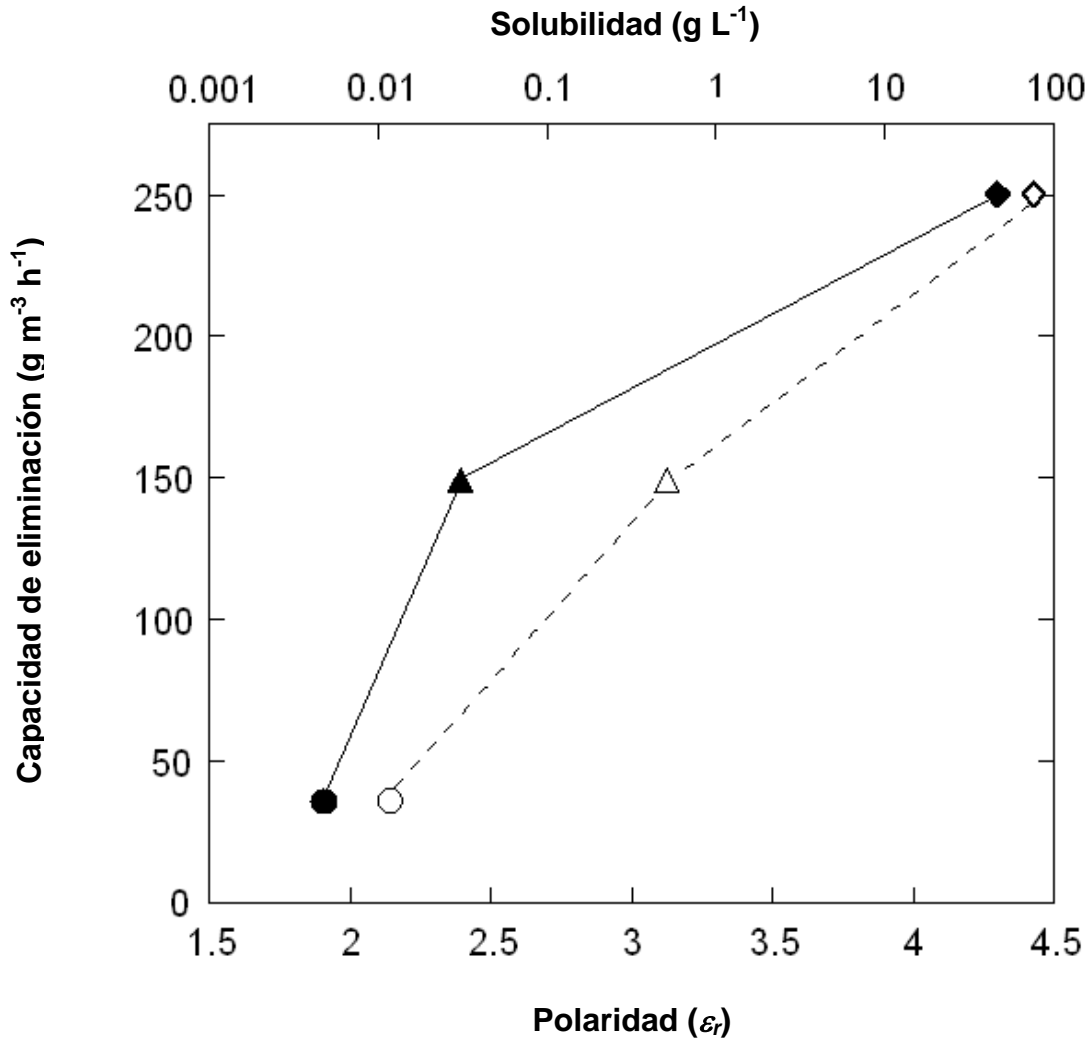
La máxima CE de n-hexano en el biofiltro empacado con perlita-salvado de trigo fue  $35 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  para cargas mayores que  $350 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Este valor fue más bajo que el valor obtenido por Arriaga y Revah (2005a) de  $110 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  con *F. solani* y  $150 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  reportado por Spigno et al. (2003) con *A. niger* usando extracto de malta como soporte (aplicando cargas  $\sim 300 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).



**Figura 3.2** Efecto de la carga de fenol (♦), tolueno (▲) y n-hexano (●) sobre la CE de *R. similis*.

### Capítulo 3

La figura 3.3 muestra la CE obtenida para cada hidrocarburo con cargas aproximadamente  $350 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  como una función de la solubilidad y polaridad de cada compuesto. Esta última está definida por la constante dieléctrica; compuestos polares como agua o etanol tienen una constante dieléctrica relativa alta (80 y 24.3 respectivamente) mientras compuestos no polares tal como oxígeno o n-hexano (1 y 1.89 respectivamente) tienen valores bajos. Esta propiedad está relacionada a la solubilidad de los compuestos. La CE muestra una correlación lineal con la polaridad. La CE de fenol fue 40% y 75% mayor que tolueno y n-hexano, respectivamente. La biodegradación de un contaminante no solo depende de su biodisponibilidad, la cual está relacionada a su solubilidad, también es importante considerar las capacidades metabólicas del microorganismo involucrado y las condiciones ambientales ( $A_w$ , temperatura, pH, etc). Mohseni y Allen (2000) aplicaron la biofiltración para degradar metanol y  $\alpha$ -pineno como sustratos separados y en mezcla y encontraron altas CE para el compuesto hidrofílico y la supresión del crecimiento de la comunidad microbiana degradadora de  $\alpha$ -pineno cuando la mezcla fue alimentada. Los resultados son consistentes a los datos reportados por Deshusses y Johnson (2000) quienes relacionaron la biodegradación de COV en biofiltros a su disponibilidad.

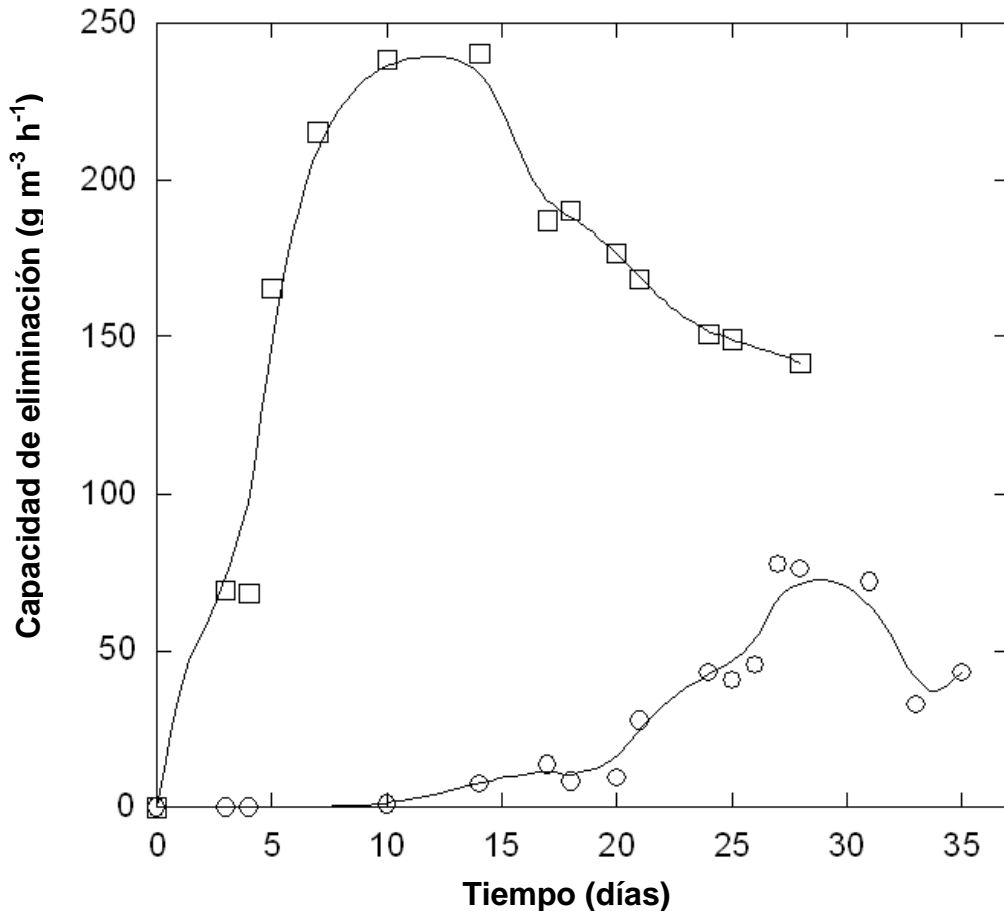


**Figura 3.3** Efecto de la constante dieléctrica ( $\epsilon_r$ ), (---símbolos abiertos) y solubilidad (—símbolos rellenos) sobre las máximas CE de fenol ( $\blacklozenge$ ), tolueno ( $\blacktriangle$ ) y n-hexano ( $\bullet$ ) de los biofiltros empacados con perlita-salvado de trigo.

### Biofiltros con COV de polaridades extremas como única fuente de carbono

La figura 3.4 muestra la evolución del consumo de hidrocarburos gaseosos en biofiltros empacados con perlita. La CE de etanol se incrementó durante los primeros días de operación del biofiltro, alcanzando valores de  $230 \text{ g etanol m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (ER 74%). La velocidad específica de consumo con etanol fue  $29.3 \text{ mg etanol g biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Después de 16 días, la CE disminuyó drásticamente lo cual puede ser atribuido a condiciones inhibitorias por la alta concentración de etanol en la

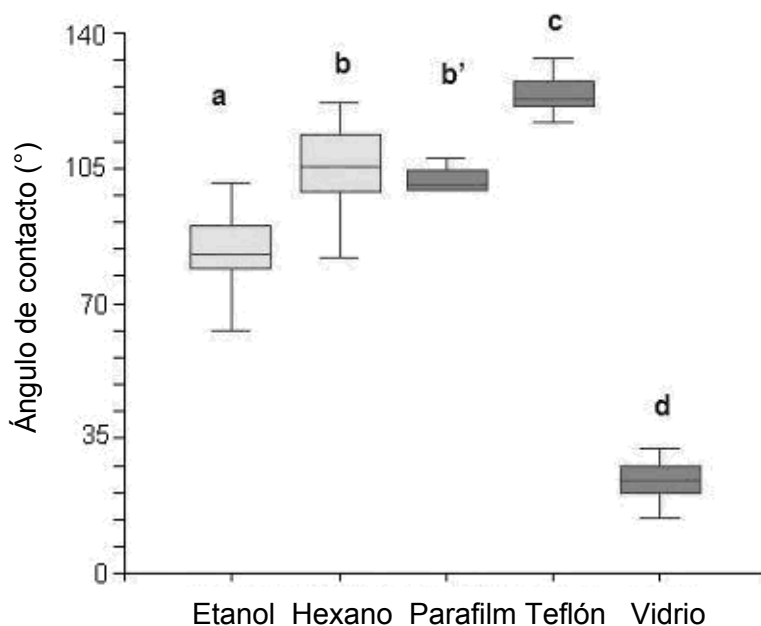
fase acuosa, limitación por oxígeno o acumulación de productos tóxicos. Christen et al. (2001) reportaron que el estado estacionario en la biofiltración de etanol por *Candida utilis* fue mantenida por 300h con una carga de etanol de  $93.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . Sin embargo, a una carga de  $511.9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , no fue observado el estado estacionario debido a la acumulación de compuestos tóxicos tales como acetaldehído, ácido acético, y acetato de etilo, los cuales son producidos por la oxidación parcial de etanol. La biofiltración de n-hexano mostró un incremento en la CE después del día 10, alcanzando,  $74 \text{ g hexano m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (ER 70%). La velocidad específica de consumo fue  $17.7 \text{ mg hexano g biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$   $17.7 \text{ mg hexano g biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$  el cual está cercano al valor de  $16.8 \text{ mg hexano g biomasa h}^{-1}$  reportado previamente por Arriaga y Revah (2005b).



**Figura 3.4** Evolución de la CE de *R. similis* en biofiltros con: etanol (□) y n-hexano (○).

**Hidrofobicidad superficial sobre el micelio**

La hidrofobicidad superficial o grado de humectabilidad fue expresada como el ángulo de contacto ( $\theta$ ) de una gota de agua sobre el micelio. La hidrofobicidad superficial de *R. similis* fue mayor cuando crece en n-hexano comparado a etanol con ángulos de contacto de 105° y 84°, respectivamente. El análisis estadístico (ver anexo A7) muestra que el micelio de *R. similis* crecido con n-hexano fue tan hidrofóbico como el control abiótico parafilm (Fig. 3.5). Algunos autores han reportado que las variaciones en la hidrofobicidad superficial del micelio dependen del medio en que crece, el estado fisiológico y la exposición al agua. Smits et al. (2003) reportaron ángulos de contacto entre 107 y 100°  $\pm$  3 para *Cladosporium* sp. cuando creció por 18 días en tres diferentes medios de cultivo. Vergara-Fernández et al. (2006) reportaron un incremento en la hidrofobicidad superficial del micelio de *F. solani* cuando creció en medio sólido con sustratos hidrofóbicos. El ángulo de contacto sobre el micelio fue 113° cuando creció con n-hexano comparado a 75° con glucosa y estos cambios fueron parcialmente explicados por un aumento en el contenido de lípidos pero también sugieren la presencia de diferentes moléculas de superficie incluyendo hidrofobinas.



**Figura 3.5** Hidrofobicidad superficial del micelio de *R. similis* obtenido por el crecimiento con etanol o n-hexano y controles abióticos (parafilm, teflón y vidrio). Las barras de error representan el error estándar. Las mismas letras significa que no existe diferencias significativas (después de ANOVA, comparación de medias por Tukey,  $P < 0.05$ )

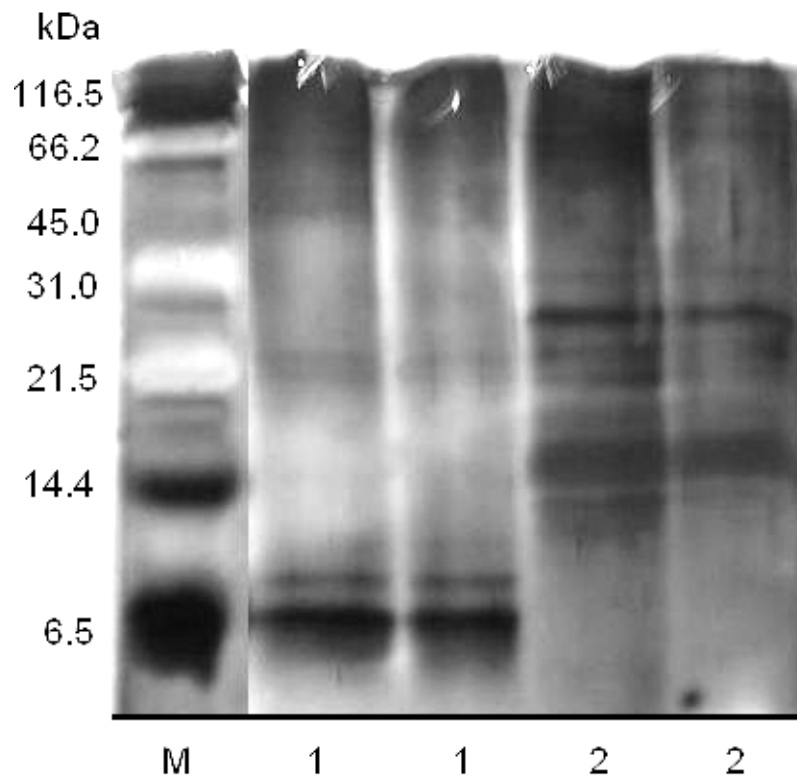
### Perfiles de las proteínas tipo hidrofobinas por SDS-PAGE

Como se ha reportado que las hidrofobinas confieren la hidrofobicidad a las superficies fúngicas en contacto con el aire (Wösten, 2001), se investigó la presencia de proteínas tipo hidrofobinas en el micelio de *R. similis*.

Diferentes perfiles de las proteínas tipo hidrofobinas fueron producidos en los biofiltros alimentados con n-hexano y etanol (figura 3.6). Del micelio producido en el biofiltro de etanol fueron extraídas proteínas de 8.5 kDa y 7 kDa las cuales no estuvieron presentes con n-hexano las cuales tuvieron alrededor de 15 kDa. Los perfiles proteicos obtenidos aquí sugieren que *R. similis* produce diferentes proteínas tipo hidrofobinas en respuesta a las propiedades fisicoquímicas de los sustratos y pueden estar relacionadas a la hidrofobicidad superficial del micelio (figures 3.5 y 3.6). Las proteínas de bajo peso molecular (7 y 8.5 kDa) producidas con etanol y extraídas con SDS son probablemente hidrofobinas clase II, las



cuales han sido reportadas por estar asociadas con el crecimiento de hongos en medios acuosos (Wösten, 2001). Algunos reportes muestran la presencia de múltiple genes de hidrofobina en el mismo hongo, *S. commune* expresa al menos cuatro diferentes hidrofobinas clase I. *T. reesei* presenta al menos tres hidrofobinas clase II y algunos hongos contienen genes que pertenecen a ambas clases de hidrofobinas, como en *C. fulvum*, *F. verticillioides* y *M. grisea* (Askolin et al. 2006).



**Figura 3.6** SDS-PAGE con gel de resolución de 15% y teñido con plata. *Líneas:* *M*, estándar de peso molecular; *1*, proteínas extraídas con SDS del micelio producido en el biofiltro con vapores de etanol; *2*, proteínas extraídas con SDS del micelio producido en el biofiltro con vapores de n-hexano.

### 3.5 Conclusión

Este es un primer reporte sobre la biodegradación de etanol, fenol, tolueno y n-hexano como sustratos individuales en biofiltro de fase gas usando a *R. similis*. La mezcla de perlita y salvado de trigo como soporte y fuente adicional de carbono

permite el crecimiento del hongo, manteniendo la biodegradación de los hidrocarburos y un rápido arranque. El desempeño de los reactores depende de la polaridad de los hidrocarburos; etanol y fenol fueron más fácilmente biodegradados que el tolueno y n-hexano. *R. similis* se adapta modificando su hidrofobicidad superficial y expresión de moléculas tipo hidrofobinas cuando crece con compuestos de polaridades opuestas, tal como etanol o n-hexano. Investigaciones relacionadas al tratamiento en biofiltros fúngicos de contaminantes gaseosos hidrofóbicos han sugerido que la actividad biosurfactante de las hidrofobinas puede tener un papel importante en la solubilidad y transferencia de COV, pero se necesita más trabajo al respecto. Basándose en los resultados de este estudio, la diversidad metabólica de *R. similis* podría ser interesante para más estudios sobre biofiltración de mezclas de COV.

### **3.6 Agradecimientos**

Los autores desean agradecer a CONACYT (SEMARNAT-120-2001) por financiar este trabajo. Además agradecemos el apoyo técnico de Sergio Hernández y la asistencia experimental de Miguel Arellano.

# 4

## **Biofiltración de tolueno en fase gas por *Paecilomyces lilacinus* y aislamiento e identificación de una proteína hidrofobina producida en el mismo**

Capítulo publicado en *Applied Microbiology and Biotechnology* (2008) 80:147–154

Gabriel Viguera, Keiko Shirai, Daniel Martins de Souza, Telma Teixeira Franco, Luciana Francisco Fleuri, Sergio Revah

### **4.1 Resumen**

*Paecilomyces lilacinus* consumió tolueno como única fuente de carbono en un biofiltro de fase gas empacado con perlita, obteniendo una CE promedio de 50 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, una ER de 53%, y una biomasa final de 31.6 mg biomasa g soporte seco<sup>-1</sup>. Del micelio producido en el biofiltro se purificó una proteína hidrofobina mediante la extracción con ácido fórmico concentrado y precipitación por electroburbujeo, con un peso molecular de 10.6±0.3 kDa. El análisis de la hidrofobina purificada mediante la huella peptídica determinada por MALDI-TOF resultó en la identificación de dos péptidos que mostraron alta homología con secuencias de hidrofobinas clase I de otros hongos ascomicetos cuando fue comparada en la base de datos de la NCBI. El rendimiento de la hidrofobia (PLHYD) de *P. lilacinus* fue 1.1 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>. Estas proteínas modificaron la hidrofobicidad del teflón disminuyendo su ángulo de contacto de 130.1 (±2)° a 57.0 (±5)° soportando lavados con SDS caliente. Este trabajo es el primer reporte sobre la biodegradación de tolueno por el hongo nematófago *P. lilacinus* en un biofiltro de fase gas y la identificación de su hidrofobina.

## 4.2 Introducción

La biofiltración es un proceso biológico utilizado para tratar aire contaminado que aprovecha la capacidad de algunos microorganismos para transformar contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos (Revah y Morgan-Sagastume 2005). La proliferación de hongos en biofiltros es frecuente debido a su capacidad para tolerar condiciones ácidas y de baja humedad en consecuencia el número de cepas fúngicas aisladas de estos sistemas se ha incrementado (Prenafeta-Boldu et al. 2001; Kennes y Veiga 2004). Los biofiltros fúngicos han mostrado mayores CE para algunos compuestos hidrofóbicos en comparación a sus contrapartes bacterianos. García-Peña et al. (2001) encontraron una CE de tolueno de alrededor de  $250 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  usando a *P. variotii*, la cual es aproximadamente cinco veces mayor que los valores reportados usualmente en biofiltros bacterianos. Con el hongo *A. niger* se han reportado CE de hexano entre  $100$  y  $150 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (Spigno et al. 2003) y mayores que  $90 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  con *F. solani* mientras que las obtenidas con consorcios bacterianos están en el rango de entre  $10$  y  $60 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (Arriaga y Revah 2005 a, b). van Groenestijn y Liu (2002) sugieren que la fisiología fúngica relacionada a fenómenos de superficie, tal como la formación de micelio aéreo e hidrofobicidad superficial, incrementan el transporte de estos compuestos. Vergara-Fernández et al. (2006) reportaron la disminución del coeficiente de partición de hexano gaseoso y el incrementó en la hidrofobicidad superficial del micelio de *F. solani* cuando crece en medio sólido con n-hexano comparado al crecimiento con compuestos menos hidrofóbicos en cultivo líquido. Por otro lado, el crecimiento de los hongos es lento, y un crecimiento excesivo puede inducir el taponamiento y formación de canales, además sus esporas pueden producir riesgos a la salud si el reactor no es operado apropiadamente (Prenafeta-Boldu et al. 2001; Aizpuru et al. 2005; Arriaga y Revah 2005b).

La hidrofobicidad superficial de los hongos está estrechamente relacionada con las hidrofobinas (Muñoz et al. 1997), pequeñas proteínas anfipáticas (~100 aminoácidos) con actividad superficial, las cuales son exclusivamente producidas por hongos filamentosos (ascomicetos y basidiomicetos). Las hidrofobinas

conservan una distribución de ocho residuos de cisteína, tienen la capacidad de autoensamblarse en la interfase hidrofílica–hidrofóbica, participan en el crecimiento aéreo, en la formación de canales aéreos para el intercambio gaseoso, en la adhesión a superficies hidrofóbicas e incrementan la resistencia a la desecación (Wessels 1997; Wösten 2001; Scholtmeijer et al. 2001; Linder et al. 2005).

Además de utilizar hongos en biofiltros para eliminar contaminantes del aire, se ha propuesto que el método de cultivo puede ser adaptado para obtener de la biomasa formada productos de valor agregado tal como la excreción de lacasa de *P. cinnabarinus* ss3 en un biofiltro empacado con bagazo de caña y alimentado con etanol gaseoso como inductor (Meza et al. 2005).

Hongos filamentosos usados en biocontrol son capaces de crecer utilizando compuestos hidrofóbicos. Napolitano y Juárez (1997) reportaron que hongos entomopatógenos fueron capaces de transformar hidrocarburos similares a los presentes en su insecto huésped en diferentes productos lipídicos, los cuales posteriormente fueron usados en la producción de energía y biosíntesis de componentes celulares. Crespo et al. (2002) mostraron que la virulencia de *B. bassiana* se incrementó cuando fue cultivado en un medio suplementado con hidrocarburos. El hongo *P. lilacinus* ha sido utilizado ampliamente en el control de nemátodos, y es capaz de metabolizar los hidrocarburos aromáticos bifenil y dibenzofurano (Gesell et al. 2001, 2004). La hidrofobicidad superficial de los hongos facilita la adhesión a la cutícula del huésped por interacciones hidrofóbicas no específicas entre la pared celular y la cutícula cerosa (Hegedus et al. 1992; Doss et al. 1993; Sosa-Gomez et al. 1997).

De ahí, este es un estudio original donde un hongo con una potencial aplicación como agente de control biológico se creció sobre un sustrato gaseoso hidrofóbico y se estudió la producción de hidrofobinas. La presencia e identificación de hidrofobinas ha sido reportada en cultivo líquido en otros hongos, pero las hidrofobinas clase I, relacionadas con el micelio aéreo, en *P. lilacinus* en un sistema gas-sólido nunca ha sido descrita, al menos hasta donde conocemos.

## 4.3 Materiales y métodos

### Cepa fúngica

*P. lilacinus* CBS 284.36, un ascomiceto, descrito como parásito de nemátodos fitopatógenos usado en control biológico. La cepa fue propagada sobre placas de agar papa dextrosa a 28°C y conservada a 4°C.

### Medio mineral

El medio mineral contiene: (g L<sup>-1</sup>) NaNO<sub>3</sub> 6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.38, CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25, CaCl<sub>2</sub> 0.055, y 4 mL L<sup>-1</sup> de solución de elementos traza conteniendo FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.015, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.012, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.013, CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0023, y CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0015. El pH del medio fue 5.3.

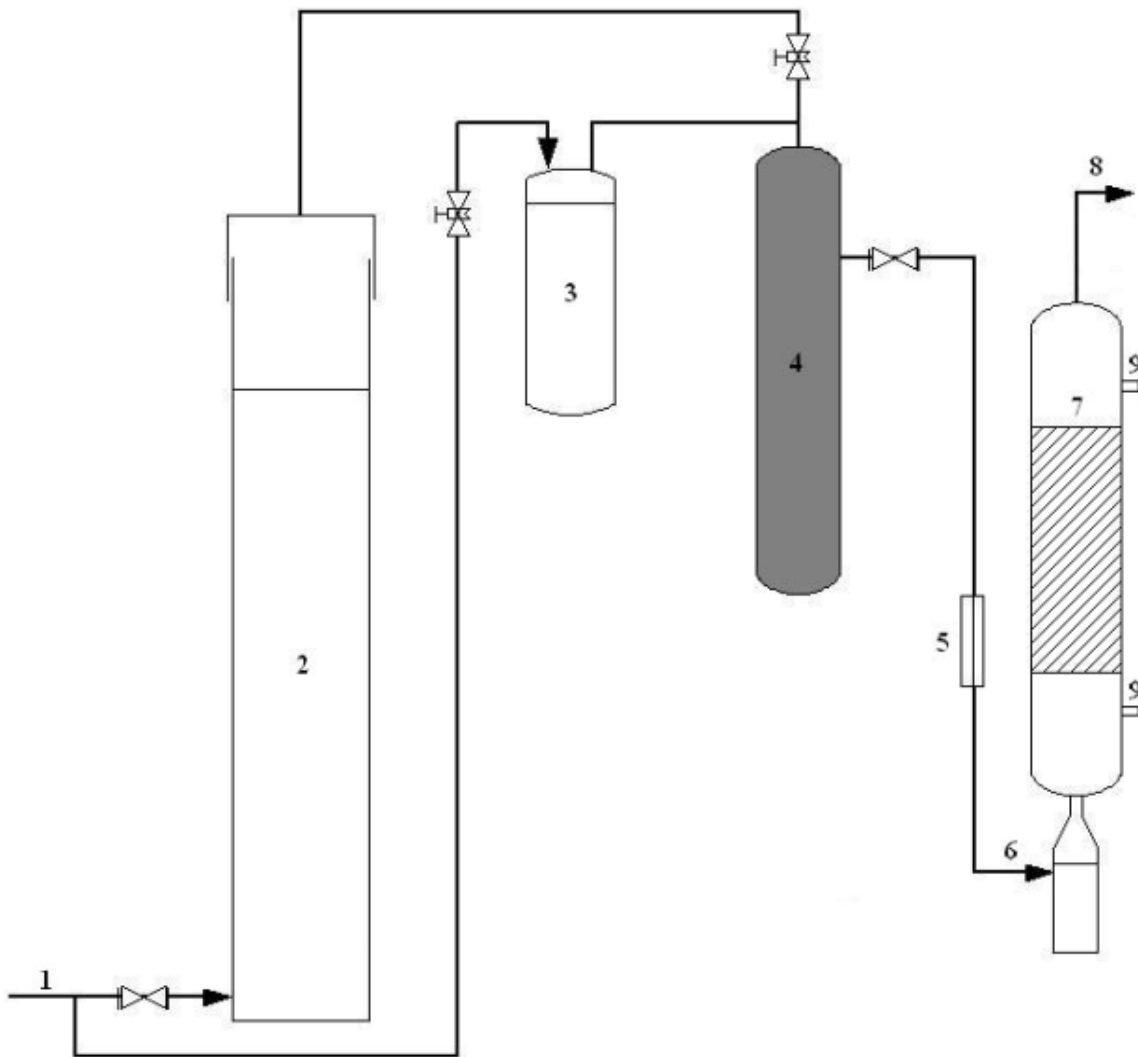
### Experimentos en microcosmos

El consumo de tolueno fue evaluado en frascos de 125-mL inoculados con  $2 \times 10^7$  esporas por mililitro. Los frascos fueron sellados con válvulas de teflón (VICI Precision Sampling) y 5 µL de tolueno líquido fueron adicionados con una microjeringa para obtener una concentración en el espacio de cabeza de 35 g m<sup>-3</sup>. Muestras control fueron preparadas sin tolueno. Todas las muestras fueron incubadas a 28°C y 180 rpm. Las concentraciones de tolueno y CO<sub>2</sub> fueron monitoreadas por cromatografía de gases (CG) de muestras del espacio de cabeza. Los experimentos fueron realizados por duplicado. La biomasa fue determinada midiendo la proteína total (Bradford 1976). El modelo integrado de Gompertz fue usado para obtener la máxima velocidad de consumo de tolueno como reportaron Acuña et al. (1999). Los parámetros del modelo fueron calculados utilizando Origin (Origin-Lab Corporation version 7.0).

### Biofiltros escala laboratorio

La figura 4.1 representa el sistema de biofiltración escala laboratorio utilizado para la biodegradación de tolueno gaseoso por *P. lilacinus*. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 28°C usando un biofiltro de vidrio de 0.230-L empacado con perlita impregnada con medio conteniendo  $2 \times 10^7$  esporas por mililitro. Una

corriente de vapores de tolueno fueron mezclados con aire húmedo y entonces pasados a través del biofiltro con un flujo de  $100 \text{ mL min}^{-1}$ , el tiempo de residencia del lecho vacío fue 1.7 min. La concentración de tolueno a la entrada fue  $5 \pm 1 \text{ g m}^{-3}$ . Después del día 10, fue adicionado al reactor cada 48 h medio mineral con antibióticos ( $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  sulfato de gentamicina y  $0.02 \text{ mg mL}^{-1}$  cloramfenicol). Las concentraciones de tolueno y  $\text{CO}_2$  en la corriente de entrada y salida del biofiltro fueron monitoreadas a intervalos de 24 h. La biomasa fue determinada midiendo la proteína total como reportaron García-Peña et al. (2001). Un gramo del soporte fue mezclado con 5 mL de ácido fosfórico (0.5 M) y calentado en un baño de agua en ebullición por 7 min. después centrifugando a  $1,380 \times g$  por 15 min. La proteína en solución fue determinada por Bradford (1976). La biomasa de *P. lilacinus* crecido en cultivo líquido fue usada como control.



**Figura 4.1** Esquema del sistema experimental, 1 aire, 2 humidificador, 3 tolueno evaporador, 4 cámara de mezclado, 5 rotámetro, 6 entrada de aire, 7 biofiltro, 8 salida de aire, 9 puertos de muestreo

### Análisis por cromatografía de gases

La concentración de tolueno fue determinada inyectando 100  $\mu\text{l}$  de muestra con una jeringa de precisión (VICI Precision Sampling) en un CG (Agilent Technologies) equipado con detector de ionización de flama y columna AT-WAX. Las condiciones de temperatura fueron las siguientes: inyector 200°C, horno 65°C, detector 250°C, y flujo de gas acarreador (helio) 0.6  $\text{ml min}^{-1}$ . La concentración de  $\text{CO}_2$  fue determinada en un detector de conductividad térmica con una columna



Poropack. Las condiciones de operación fueron: inyector 110°C; horno 65°C; y detector 110°C, flujo de gas acarreador 4.4 ml min<sup>-1</sup>. Las mediciones fueron realizadas por duplicado.

### **Extracción y purificación de hidrofobinas**

Las hidrofobinas fueron extraídas del micelio previamente producido en el biofiltro de acuerdo a una versión modificada del procedimiento descrito por Ying y Feng (2004). Una extracción con SDS 2% en amortiguador de Tris-HCl 100mM pH 9.0, fue realizada durante 2 h a temperatura ambiente seguido por centrifugación a 7,500×g y 4°C por 10 min. El pellet se resuspendió en ácido fórmico concentrado y sonicando 3 veces durante 30 s en agua helada. Las proteínas solubles en FA fueron separadas por centrifugación a 7,500×g y 4°C por 10 min. El sobrenadante fue neutralizado con una solución de NaOH al 45% (p/v) a pH 7.0 y conservado a 4°C toda la noche. La solución neutralizada fue centrifugada a 1,500×g y 4°C por 10 min, y el pellet fue resuspendido en amortiguador Tris HCl 100mM pH 8.0. Las hidrofobinas fueron precipitadas por electroburbujeo en una columna de vidrio con un filamento de platino en el fondo; 300mA fueron aplicados durante 1h, y la espuma fue colectada y liofilizada (Lugones et al. 1998). La hidrofobina fue purificada por ultrafiltración con un concentrador Centricon-10 (Amicon). El método de Bradford fue utilizado para determinar el contenido total de proteína.

### **Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular**

El HPLC-SEC fue utilizado con una columna de filtración en gel de 5 µm Bio-Silect 250 SEC (30cm x 7.8mm ID; Bio-Rad). El volumen de inyección fue 20 µL y la fase móvil consistió en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05M y NaCl 0.15M, pH 6.8. El flujo fue 1.0 ml min<sup>-1</sup> y la detección se realizó a 280 nm. Un estándar de peso molecular (Bio-Rad) fue utilizado para calibrar el sistema.

### **Análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS**

Los perfiles de proteínas fueron analizados en base al peso molecular por SDS-PAGE usando la técnica de Laemmli (1970). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 o tinción de plata. Las bandas de proteína fueron analizados con un programa para el procesamiento de imágenes (PQQuest Basic 8.0.1, Bio-Rad), usando un estándar de proteínas de amplio rango (Invitrogen).

### **Análisis por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa**

Las muestras de proteína fueron analizadas por HPLC-RP de acuerdo a Tagu et al. (2000) usando una columna de 5  $\mu\text{m}$  Supelcosil LC 304 (25cm x 4.6mm ID) protegida por un guarda columna de 5  $\mu\text{m}$  Supelguard LC 304 (2cm x 4.6mm ID; Supelco). El volumen de inyección fue 20  $\mu\text{L}$  y la fase móvil consistió de TFA 0.1% (p/v) y acetonitrilo 50% (v/v) con un pH de 3.0. El flujo fue 0.8 ml  $\text{min}^{-1}$  y la detección fue realizada a 280 nm.

### **Identificación de hidrofobinas por huella peptídica usando MALDI-TOF**

Los péptidos de hidrofobina fueron extraídos del gel SDS-PAGE seguido por una digestión triptica en gel de acuerdo a Schevchenko et al. (1996) usando tripsina porcina modificada grado secuenciamiento (Promega-adison). Los péptidos fueron purificados usando puntas ZipC18 (Millipore), y eluyendo directamente con una solución matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxycinnamico (Sigma) al 2% p/v, acetonitrilo 60% y TFA 0.1% v/v en la placa muestra. Los péptidos fueron analizados sobre un Voyager DE-PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se realizó una calibración interna usando productos de tripsina autodigeridos (842.509, 1,045.563, y 2,211.104 Da). Las masas de picos monoisotópicos fueron usados para la búsqueda en la base de datos NCBI usando el programa MS-Fit de la Universidad de California, San Francisco (<http://169.230.19.26:8080/prospector/4.27.1/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>).

### **Actividad superficial sobre sólido hidrofóbico**

La actividad superficial de la hidrofobina fue evaluada sobre una superficie hidrofóbica de 0.25-cm<sup>2</sup> de politetrafluoroetileno (ó teflón). La superficie hidrofóbica fue previamente lavada tres veces con etanol, enjuagada tres veces con agua y secadas al aire por 12h. Entonces 200  $\mu$ L de una solución de hidrofobina (52.5  $\mu$ g proteína ml<sup>-1</sup>) fueron colocados en la superficie de teflón y secada por 16h. Se realizó un lavado con SDS 2% a 90°C por 1 minuto, y enjuagando tres veces secando después por 16h de acuerdo a Wösten et al. (1994). Muestras controles fueron preparados sin solución de hidrofobina. La hidrofobicidad superficial se determino midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua (1  $\mu$ L) con un goniómetro (CAM-Micro 600, Tantec). El análisis se realizo por sextuplicado en tres diferentes puntos de cada superficie.

## **4.4 Resultados**

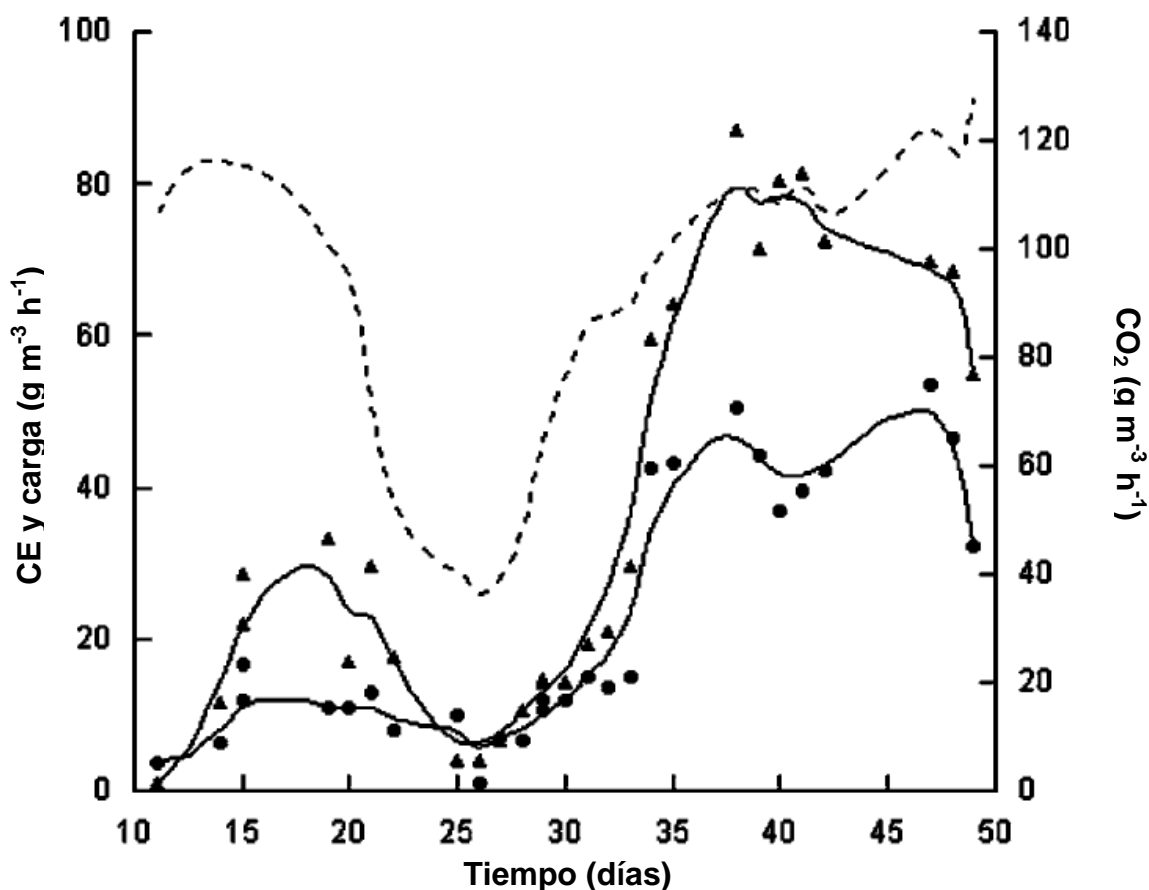
### **Experimentos en microcosmos**

El crecimiento de biomasa en los microcosmos adicionados con tolueno inició en el día 4; una abundante formación de biomasa fue observada, cuando se comparó con los experimentos control (sin fuente de carbono), el cual no mostró un crecimiento significativo aun después de 20 días de exposición. Los datos experimentales de consumo de tolueno fueron ajustados con el modelo de Gompertz estimando una Vmax of 5.15 mg tolueno g biomasa<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, con un consumo total de 53% y mineralizando 44.3% del tolueno consumido a CO<sub>2</sub> correspondiendo a 1.44 mg CO<sub>2</sub> mg tolueno<sup>-1</sup>.

### **Experimentos de biofiltración**

Desde el día 8, el crecimiento fue visible sobre el soporte sólido, formándose algunos pellets en el lixiviado. La carga de tolueno promedio a la entrada de la columna fue 91 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> con fluctuaciones en el flujo de aire (80±10 mL min<sup>-1</sup>). La evolución del consumo de tolueno en el biofiltro se muestra en la figura 4.2. La CE y producción de CO<sub>2</sub> se incrementó desde el día 10, alcanzando valores de 50 y 120 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. La disminución en la CE y producción de CO<sub>2</sub>

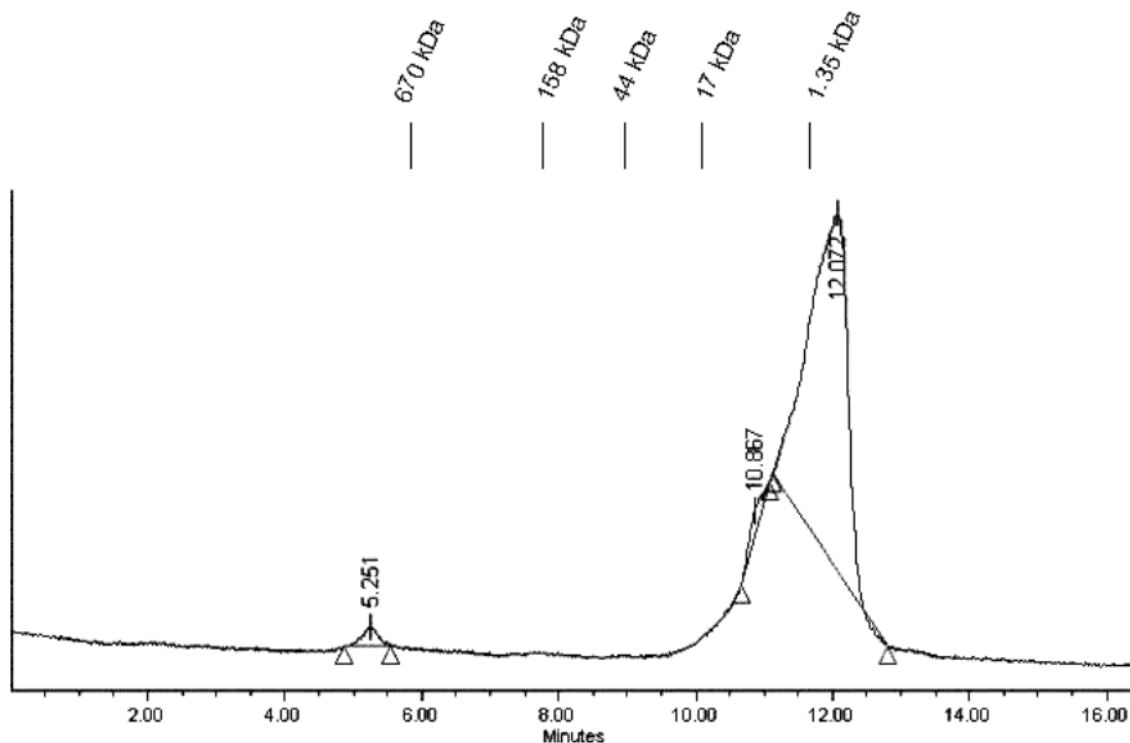
entre los días 22 y 28 fue debida a baja carga a la entrada del reactor. La máxima ER de 53% fue alcanzada al día 34. La biomasa final fue 31.6 mg biomasa g soporte seco<sup>-1</sup>.



**Figura 4.2** Evolución de la carga (---), CE de tolueno (●) y producción de CO<sub>2</sub> (▲) en el biofiltro inoculado con *P. lilacinus*

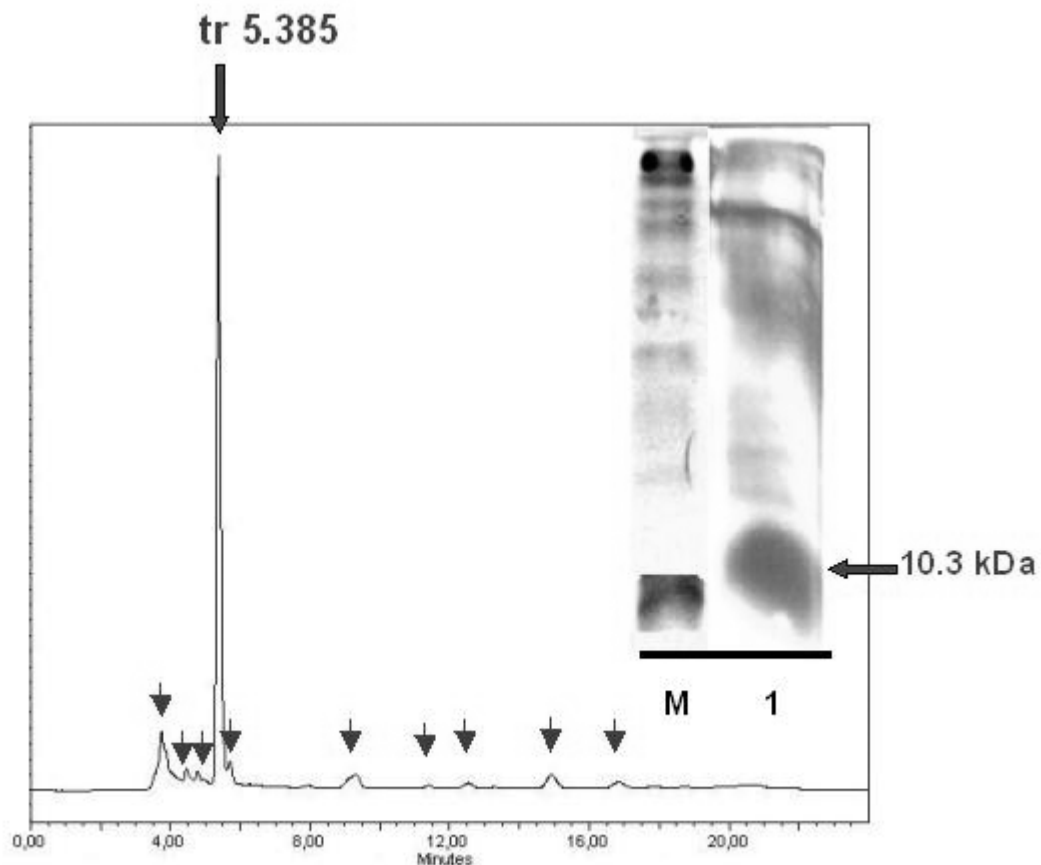
### Purificación e identificación de hidrofobinas

La figura 4.3 muestra el cromatograma del HPLC-SEC del material precipitado por electroburbujeo después de la extracción del micelio obtenido en el biofiltro. El mayor pico detectado corresponde a péptidos menores que 1.35 kDa, seguidos por proteínas de bajo peso molecular, de entre 17 y 1.35 kDa.



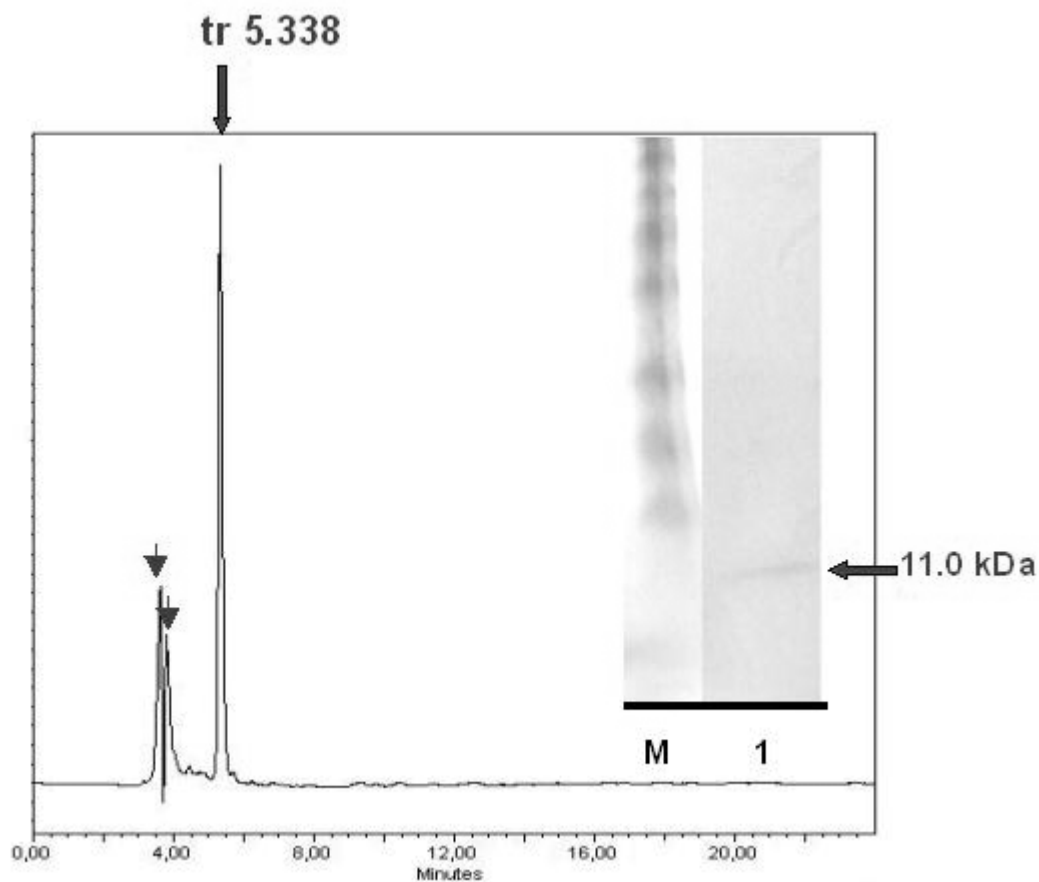
**Figura 4.3** HPLC-SEC de las proteínas precipitadas por electroburbujeo y extraídas del micelio de *P. lilacinus* obtenido en el biofiltro con vapores de tolueno. En la parte superior del cromatograma se indica el peso molecular del estándar.

El SDS-PAGE y HPLC-RP (Fig. 4.4) mostraron una banda densa asignada a proteínas de bajo peso molecular (10.3 kDa), el cual fue determinado en un gel al 17% teñido con plata. El cromatograma muestra 10 picos; el más intenso (70% de área) fue detectado en 5.3 min en un sistema isocrático de acetonitrilo-agua 50:50.



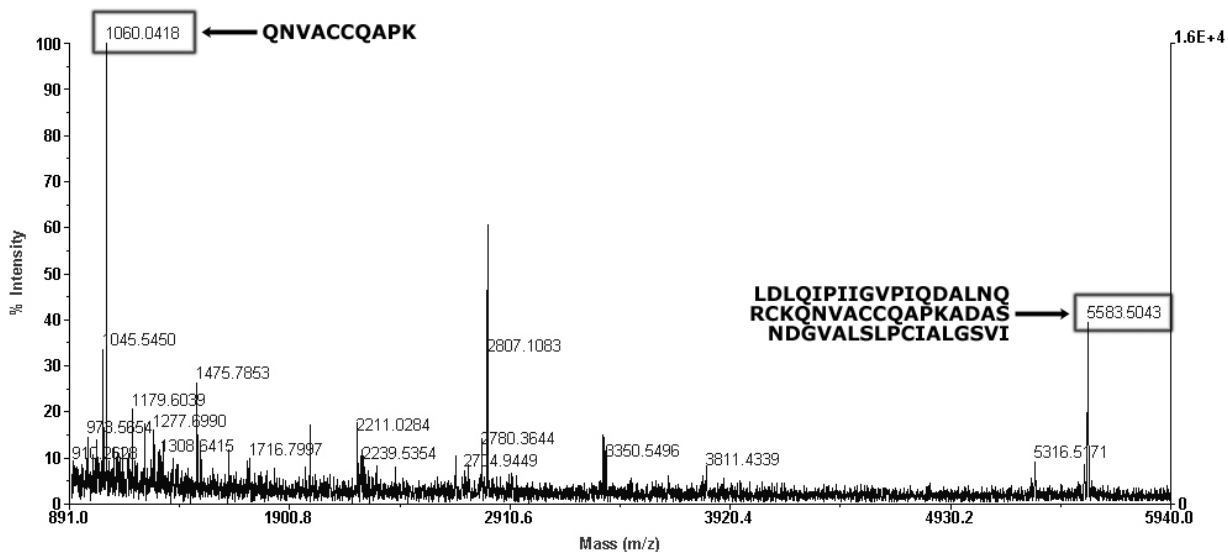
**Figura 4.4** HPLC-RP y SDS-PAGE (gel 17% teñido con plata). *Línea M*, estándar de peso molecular. *Línea 1*, hidrofobina precipitada por electroburbujeo del micelio de *P. lilacinus* producido en el biofiltro con vapores de tolueno.

La figura 4.5 muestra el análisis de la hidrofobina purificada. El peso molecular aparente fue 11 kDa determinado en un gel al 15% teñido con azul de Coomassie. El cromatograma del HPLC-RP muestra solamente tres picos; el más intenso (60% de área) fue detectado en 5.3 min, el cual probablemente corresponde a la hidrofobina. Los otros dos picos no fueron identificados. El rendimiento final de hidrofobina calculado en relación a la biomasa ( $Y_{\text{PLHYD}/X}$ ) fue  $1.1 \text{ mg PLHYD g biomasa}^{-1}$ .



**Figura 4.5** HPLC-RP y SDS-PAGE (gel 15% teñido con azul de Coomassie). *Línea M*, estándar de peso molecular. *Línea 1*, hidrofobina PLHYD purificada del micelio de *P. lilacinus* crecido en el biofiltro con vapores de tolueno.

La figura 4.6 muestra la huella peptídica de la hidrofobina obtenida por MALDI-TOF de la proteínas de 11 kDa separada por SDS-PAGE. Las masas de los péptidos de hidrofobina, resultantes de la digestión trípica, fueron buscados en la base de datos de la NCBI. De ahí, dos secuencias peptídicas fueron identificadas; el pico más intenso corresponde a un péptido de diez aminoácidos (1,060.0418 Da) y el otro a un péptido de 52 aminoácidos (5,583.5043 Da). Ambos mostraron un 100 % de homología con una porción de una secuencia de hidrofobina del ascomiceto *Aspergillus clavatus*.



**Figura 4.6** Huella peptídica obtenida por MALDI-TOF de la hidrofobina PLHYD de *P. lilacinus*. Encima de cada pico se muestran la masa y secuencia de aminoácidos.

El ensayo de actividad superficial de la hidrofobina PLHYD mostró su capacidad para modificar la hidrofobicidad del teflón disminuyendo el ángulo de contacto de  $130.1 (\pm 2)^\circ$  a  $57.0 (\pm 5)^\circ$  aún después de algunos lavados con SDS al 2% caliente.

## 4.5 Discusión

Los experimentos en microcosmos mostraron que el nematódago *P. lilacinus* fue capaz de crecer utilizando tolueno como la única fuente de carbono y energía. Estos experimentos fueron conducidos en frascos sellados, donde el consumo de sustrato, la acumulación de  $\text{CO}_2$ , y la formación de biomasa fueron monitoreados. Reportes previos muestran que algunos hongos filamentosos son capaces de biodegradar tolueno en fase gas (Prenafeta-Boldu et al. 2001; García-Peña et al. 2001; Spigno et al. 2003; Kennes y Veiga 2004; Arriaga y Revah 2005a, b).

Como este es el primer reporte sobre la biodegradación de tolueno por *P. lilacinus*, se decidió continuar los estudios en un biofiltro de fase gas, un sistema similar a la fermentación en estado sólido pero usando tolueno gaseoso como



sustrato. Obteniendo CE máximas de alrededor de  $50 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (ER 53%) con *P. lilacinus*. Estos valores fueron similares a las CE volumétricas de  $55 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (ER=99%) reportada para *P. variotii* CBS 113409 por Estévez et al. (2005) pero menores a las obtenidas con *Exophiala oligosperma* (CE= $77 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y ER=99%), por *Exophiala lecanii-corni* (CE= $80 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y ER= 95%; Woertz et al. 2001), y *P. variotii* CBS 115145 (CE= $200 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  y ER=98%; García-Peña et al. 2005; Aizpuru et al. 2005). Por otro lado, el valor de la CE específica de  $13.5 \text{ mg tolueno g biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$  obtenida con *P. lilacinus* fue similar al valor de  $10 \text{ mg tolueno g biomasa}^{-1} \text{ h}^{-1}$  reportado por Aizpuru et al. (2005) con *P. variotii*. La diferencia en el desempeño puede ser explicada parcialmente por el incremento en la biomasa alcanzado con *P. variotii*, el cual fue favorecido por la inclusión de glucosa al inicio, la adición de medio mineral con altas concentraciones de nitrógeno, y por los períodos más largos de crecimiento. Además, a pesar de ser del mismo género, *P. variotii* está probablemente mejor adaptado a las condiciones encontradas en biofiltros ya que fue originalmente aislado de un biofiltro alimentado con tolueno (Auria et al. 2000) y ha sido aislado en otros lugares bajo condiciones similares (Estévez et al. 2005), mientras *P. lilacinus* es una cepa de colección.

A partir del micelio producido en el biofiltro, fue purificada una hidrofobina clase I por extracción con FA y precipitación por electroburbujeo. La mayoría de los protocolos reportados para purificar hidrofobinas se basan esencialmente en extracciones con SDS al 2% (removiendo hidrofobinas clase II e impurezas) y TFA o FA (solubilización de hidrofobinas clase I), utilizando en el paso final de purificación algún método cromatográfico. El electroburbujeo fue un método utilizado para precipitar y aislar hidrofobinas producidas en cultivo líquido por Lugones et al. (1998) y Sarlin et al. (2005). El HPLC-SEC fue usado en el presente trabajo como una herramienta analítica para identificar proteínas de bajo peso molecular entre 1.35 y 17 kDa. El SDS-PAGE de esta fracción mostró posteriormente una proteína de bajo peso molecular entre 10.3 y 11 kDa, el cual corresponde al peso molecular de hidrofobinas reportadas, alrededor de 12 kDa (Wessels 1997). La variación observada en la movilidad en gel puede ser debida a

pequeñas diferencias de las regiones hidrofóbicas de las hidrofobinas y a la formación entre cisteínas de puentes disulfuro intramoleculares (Tagu et al. 2000).

El HPLC-RP mostró un pico correspondiente a una proteína hidrofobina. Tagu et al. (2000) reportaron la purificación y análisis de una hidrofobina clase I HYDPT-1 por HPLC-RP que eluyó en 43% (v/v) a través de un gradiente de acetonitrilo en una columna con características similares.

El análisis de la huella peptídica por MALDITOF de la hidrofobina purificada de 11 kDa, buscados en la base de datos NCBI resultó en la identificación de dos péptidos que presentaron alta homología con secuencias de hidrofobinas en otras especies de hongos. El pico de masa 5,583.5043 Da (Fig. 4.6) es idéntico a una masa peptídica generada de una digestión trípica de una hidrofobina de 14.6 kDa designada ACLA-048810 aislada del ascomiceto *A. clavatus*. También fue encontrada una similitud mayor a 50% con otras 76 secuencias de hidrofobinas clase I presentes en diferentes hongos ascomicetos (ver anexo A13).

Las hidrofobinas clase I tienen un patrón consenso  $X_{26-85}-C-X_{5-8}-C-C-X_{17-39}-C-X_{8-23}-C-X_{5-6}-C-C-X_{6-18}-C-X_{2-13}$ , y se autoensamblan para formar agregados muy estables que solo pueden ser disociados con TFA y FA concentrado; este tipo de hidrofobinas forman rodlets, los cuales están relacionados con la cubierta hidrofóbica de la superficie del micelio de hongos filamentosos (Wessels 1997; Wösten 2001; Linder et al. 2005). Wösten et al. (1999) reportaron un rendimiento de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de la hidrofobina clase I SC3 de *S. commune* en un medio acuoso, por otro lado Askolin et al. (2001) con *T. reesei* reportaron  $600 \text{ mg L}^{-1}$  en un sistema similar correspondiendo al 20% del total de hidrofobina clase II HFB producida; sin embargo, la mayor parte de la hidrofobina interfasesba unida a la pared celular ( $4.9 \text{ mg g biomasa}^{-1}$ ). Nuestro rendimiento final de  $1.1 \text{ mg PLHYD g biomasa}^{-1}$  fue cuatro veces menor que el reportado con la HFBI; sin embargo, esta cepa de *T. reesei* fue genéticamente modificada para tener un mayor número de copias del gen *hfb1*.

La propiedad característica de las hidrofobinas es la adsorción a una interfase hidrofóbica-hidrofílica, en la cual forman una película anfipática (Wessels 1997; Wösten 2001; Scholtmeijer et al. 2001; Linder et al. 2005). La hidrofobicidad

(o humectabilidad) de una superficie sólida puede ser estimada por la medición del ángulo de contacto de una gota de agua sobre el sólido. En nuestro estudio, la hidrofobina PLHYD fue capaz de modificar la hidrofobicidad de teflón disminuyendo el ángulo de contacto de  $130.1 (\pm 2)^\circ$  a  $57.0 (\pm 5)^\circ$  y tolerando lavados con SDS caliente. Estos resultados coinciden con el trabajo reportado Wösten et al. (1994) donde una cubierta de la hidrofobina SC3 sobre teflón disminuyó el ángulo de contacto de  $108 \pm 2^\circ$  a  $62 \pm 8^\circ$  después de extracciones con SDS caliente. La reducción efectiva de la hidrofobicidad por las hidrofobinas puede ser importante en el contacto inicial de *P. lilacinus* a la capa superficial de los nemátodos y su posterior infección.

Este es el primer estudio sobre la biodegradación de tolueno gaseoso utilizando a *P. lilacinus*, un hongo nematófago, y la preliminar caracterización de su hidrofobina. Actualmente la investigación está orientada a incrementar ambas, concentración de biomasa y producción de proteína, y evaluar la virulencia de *P. lilacinus* contra sus hospederos.

## 4.6 Agradecimientos

Los autores agradecen a SEP-CONACYT (2004-C01-46173) por el financiamiento de la investigación y por la beca de doctorado de Gabriel Viguera, también gracias a la Unión Europea a través del proyecto Alfa PolyLife.



# 5

## Determinación de la hidrofobina PLHYD de *Paecilomyces lilacinus* al crecer con n-hexadecano en medio sólido y líquido

*Parte de este capítulo fue publicado en Proceedings of the 3rd International Congress Biotechniques for Air Pollution Control (2009) 112-117  
Gabriel Viguera, Keiko Shirai, Marcia Morales, Sergio Revah*

### 5.1 Resumen

*Paecilomyces lilacinus* un hongo con potencial aplicación para el control biológico de nemátodos fitopatógenos fue capaz de crecer en medio sólido y líquido utilizando HXD como única fuente de carbono. La actividad respiratoria en cultivo líquido con HXD ( $V_{max}$  1.16 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>) fue dos veces mayor que en medio sólido con HXD ( $V_{max}$  0.57 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>). El HPLC-RP fue utilizado como herramienta analítica para la cuantificación de hidrofobinas. Del micelio producido en medio sólido se purificó la hidrofobina PLHYD de 10 kDa, la cual mostró actividad superficial sobre teflón al disminuir su hidrofobicidad de 130.1 ( $\pm 2$ )° a 60.0 ( $\pm 5$ )° y soportar lavados con SDS caliente. El rendimiento final obtenido fue de 0.8 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>. En el micelio producido en medio líquido no se logró encontrar la hidrofobina PLHYD. Este es el primer estudio sobre la biodegradación de HXD por *P. lilacinus* en cultivo sólido y recuperación de su hidrofobina PLHYD.

## 5.2 Introducción

La capacidad de algunos hongos filamentosos para infectar insectos, nemátodos, plantas u otros hongos, los convierte en un importante grupo para el control biológico de diversas plagas. Los hongos filamentosos son capaces de desarrollarse sobre superficies hidrofóbicas como son la cutícula de insectos y plantas, las cuales se encuentran cubiertas con ceras, compuestas por una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos, cetonas, alcoholes secundarios, monoésteres, poliésteres, alcoholes primarios, aldehídos, ácidos carboxílicos, terpenos y esteroides. Se ha reportado que la degradación de hidrocarburos cuticulares es una ruta metabólica utilizada por hongos para obtener energía. Por degradación enzimática el hongo penetra la cutícula de su huésped, la cual contiene ceras, entre ellas hexadecano (Napolitano y Juárez, 1997, Crespo et al. 2002). Crespo et al. (2002) reportaron que al adicionar el medio con n-hexadecano se incrementó la virulencia de *B. bassiana* contra su huésped. En estudios sobre el tratamiento de contaminantes se han encontrado hongos capaces de utilizar hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) como única fuente de carbono (Prenafeta-Boldu et al. 2005, García-Peña et al. 2005). *P. lilacinus* es un hongo filamentoso utilizado para el biocontrol de nemátodos fitopatógenos, capaz de metabolizar los hidrocarburos aromáticos bifenil y dibenzofurano (Gesell et al. 2001, 2004), así como tolueno en un biofiltro de fase gas (Vigueras et al. 2008). El HXD es un compuesto que ha sido utilizado como modelo para el estudio de la biodegradación de hidrocarburos alifáticos (Volke-Sepúlveda et al. 2003, Graham et al. 1999), la tasa de consumo de HXD es hasta 6 veces mayor que la de naftaleno y 3 veces mayor que la de fenantreno, lo que permite una relativamente rápida producción de biomasa (Inakollu et al. 2004). También se ha observado que la adición de HXD promueve la síntesis de biosurfactantes en géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium* (Bouchez-Naïtali et al. 1999). Los hongos filamentosos producen unas proteínas anfipáticas de bajo peso molecular (~10 kDa) con actividad biosurfactante llamadas hidrofobinas. Las cuales tienen una distribución conservada de ocho residuos de cisteína, pueden adsorberse a superficies

hidrofóbicas y entre las interfases hidrofóbica (aire, aceite y ceras) e hidrofílica (agua y pared celular). Estas proteínas forman una cubierta protectora hidrofóbica sobre la superficie de hifas aéreas ó esporas, permitiendo la adhesión de estas estructuras a la superficie hidrofóbica del huésped (cutícula) (Wessels 1994; Linder et al. 2005). Se ha sugerido que el micelio aéreo hidrofóbico de los hongos podría favorecer la partición de contaminantes hidrofóbicos a la biomasa fúngica (Arriaga y Revah, 2005a; Vergara-Fernández et al. 2006). La actividad superficial de estas proteínas es de interés para aplicaciones biotecnológicas tal como la inmovilización de biosensores en superficies sólidas y como surfactante en sistemas líquidos de dos fases (Linder et al. 2005).

De ahí resulta importante realizar experimentos sobre el crecimiento de *P. lilacinus* con HXD en cultivo sólido y líquido, e investigar la expresión de su hidrofobina PLHYD.

## 5.3 Materiales y métodos

### Cepa fúngica

*P. lilacinus* CBS 284.36 un hongo ascomiceto parásito de nemátodos fitopatógenos. La cepa fue propagada sobre agar papa dextrosa a 28°C y conservada a 4°C.

### Medio mineral

El medio mineral contiene: (g L<sup>-1</sup>) NaNO<sub>3</sub> 6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.38; CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25; CaCl<sub>2</sub> 0.055; y 4 ml L<sup>-1</sup> solución de elementos traza, conteniendo (g L<sup>-1</sup>) FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.015; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.012; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.013; CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0023; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.0015. El pH del medio fue 5.3.

### Experimentos en microcosmos

*P. lilacinus* fue cultivado dentro de botellas de 125 ml en medio líquido y sólido (perlita) con medio mineral y n-hexadecano (36.5 g L<sup>-1</sup>) emulsionado con 0.1% de Tween 80 e inoculado con 2x10<sup>7</sup> esporas mL<sup>-1</sup>. Las botellas fueron

selladas con válvulas de teflón Mininert (VICI Precision Sampling). Se prepararon controles sin HXD. La incubación se realizó a 28°C y 180rpm. Del espacio de cabeza se tomaron muestras para medir la concentración de CO<sub>2</sub> por cromatografía de gases y los datos fueron ajustados al modelo de Gompertz para obtener la V<sub>max</sub> de producción de CO<sub>2</sub> como medida indirecta del crecimiento. Los parámetros del modelo fueron calculados con el programa Origin versión 7.0 (OriginLab Corporation, 1991-2002). Los experimentos fueron realizados por duplicado. La biomasa se determinó midiendo la proteína total por el método de Bradford (1976). La biomasa de *P. lilacinus* crecido en cultivo líquido fue usada como control. En el modelo matemático  $P_C$  es la producción de CO<sub>2</sub> y está en función del tiempo  $t$  de acuerdo a la siguiente ecuación:  $P_C = P_{\max} e^{(-Be^{-kt})}$  donde  $P_{\max}$  es la máxima concentración de CO<sub>2</sub> producida (cuando  $t \rightarrow \infty$ ),  $B$  es un parámetro relacionado a las condiciones iniciales (cuando  $t=0$ , entonces  $P_C = P_{\max} e^{(-B)}$ ) y  $k$  es la constante de velocidad de producción de CO<sub>2</sub>. La máxima velocidad de producción de CO<sub>2</sub> (V<sub>max</sub>) fue calculada del modelo de Gompertz como  $V_{\max} = 0.368kP_{\max}$

### **Análisis por cromatografía de gases**

La concentración de CO<sub>2</sub> fue determinada inyectando 100 µL de muestra con una jeringa de precisión (VICI Precision Sampling) dentro de un CG (Agilent Technologies) equipado con un detector de conductividad térmica y una columna Poropack. Las condiciones de operación fueron: inyector 110°C, horno 65°C, detector 110°C, y la velocidad de flujo del gas acarreador (helio) fue 4.4 mL min<sup>-1</sup>. Todas las mediciones fueron realizadas por duplicado.

### **Extracción y purificación de hidrofobinas**

Para eliminar el HXD residual de la biomasa producida en los cultivos, se realizaron dos lavados con n-hexano. Posteriormente se siguió el protocolo reportado previamente para extraer con ácido fórmico concentrado y purificar por electroburbujeo la hidrofobina de clase I PLHYD (Vigueras et al. 2008).



### **Análisis de proteínas por cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular (HPLC-SEC) y electroforesis SDS en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las muestras de las proteínas obtenidas del micelio producido en medio líquido o sólido fueron analizadas por HPLC-SEC y SDS-PAGE para determinar su perfil y peso molecular, siguiendo las condiciones reportadas previamente (Vigueras et al. 2008).

### **Cuantificación de hidrofobina por cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (HPLC-RP)**

Las muestras de proteína fueron analizadas por HPLC-RP usando una columna de 5  $\mu\text{m}$  Supelcosil LC 304 (25cm x 4.6mm ID) protegida con una guarda columna de 5  $\mu\text{m}$  Supelguard LC 304 (2cm x 4.6mm ID) (Supelco). El volumen de inyección fue 100  $\mu\text{L}$ . La fase móvil consistió de ácido trifluoroacético 0.1% (p/v) (fase A) y ácido trifluoroacético 0.1% (p/v) en acetonitrilo (fase B) con un pH de 3.0. Las proteínas fueron eluidas mediante el siguiente gradiente de acetonitrilo: 20–40% en 15 min, 40–80% en 20 min, 80–90% en 2 min y 90% en 3 min. El gradiente fue retornado a 20% en 5 min. El flujo fue 1.0 ml min<sup>-1</sup> y la detección se realizó a 280 nm. Se construyó una curva estándar desde 0 hasta 120  $\mu\text{g}$  de BSA. Además se inyectaron 3 diferentes niveles de concentración de la hidrofobina PLHYD. El contenido de proteína se determinó por Bradford (1976) (ver anexo A6).

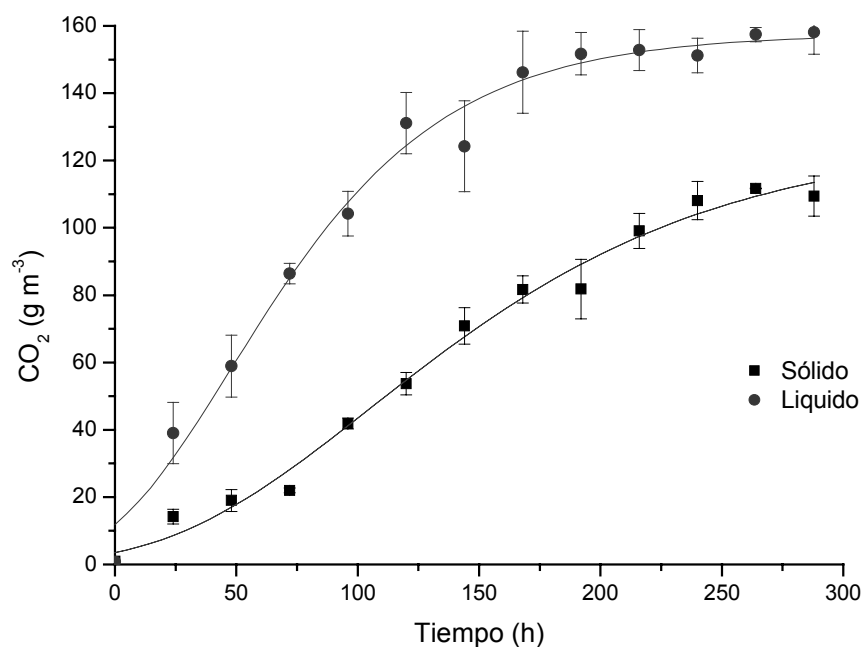
### **Actividad superficial sobre un sólido hidrofóbico**

La actividad superficial de la hidrofobina fue evaluada sobre una superficie hidrofóbica de politetrafluoroetileno (teflón) (Wösten et al. 1994). Se determinó la hidrofobicidad de las superficies midiendo el ángulo de contacto de una gota de agua (1  $\mu\text{L}$ ) determinado de fotografías digitales capturadas con un microscopio horizontal Intel Qx3 (Intel Corporation) y analizadas el programa ImageJ1.37v (National Institutes of Health, USA). Los experimentos se realizaron por duplicado, con tres mediciones en diferentes puntos de cada muestra.

## 5.4 Resultados y discusión

### Consumo de n-hexadecano en microcosmos.

*P. lilacinus* fue capaz de crecer utilizando el hidrocarburo alifático n-hexadecano ( $36.5 \text{ g L}^{-1}$ ) como única fuente de carbono y energía. La figura 5.1 muestra los datos de la cinética de producción de  $\text{CO}_2$  ajustados al modelo de Gompertz, la  $V_{\text{max}}$  obtenida en medio líquido con HXD  $1.16 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  ( $0.086 \text{ mmol CO}_2 \text{ día}^{-1}$ ) fue dos veces mayor que la obtenida en medio sólido  $0.57 \text{ g CO}_2 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  ( $0.038 \text{ mmol CO}_2$ ). La biomasa final fue de  $5.34 \text{ mg biomasa ml}^{-1}$  ( $12.3 \text{ mg biomasa g soporte seco}^{-1}$ ) en FMS y de  $8.73 \text{ mg biomasa ml}^{-1}$  en FML. Mostrando un crecimiento más lento en medio sólido que en medio líquido.



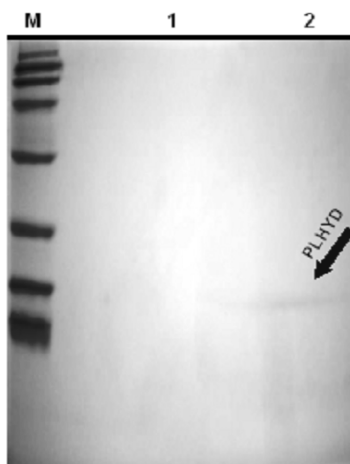
**Figura 5.1** Cinética de  $\text{CO}_2$  producido por *P. lilacinus* al crecer con n-hexadecano en medio líquido y sólido

Este resultado contrasta con el reportado por Volke-Sepúlveda et al. (2003) quienes mostraron que el consumo de HXD por *Aspergillus niger* fue tres veces mayor y el crecimiento fúngico 30 veces más rápido en FMS respecto al FML. Esta

gran diferencia pudo deberse a que la concentración del medio mineral en FMS fue tres veces mayor que la utilizada en FML. Posteriormente Volke-Sepúlveda et al. (2006) mostraron la influencia de la relación C/N en la biodegradación de HXD, mostrando que bajo condiciones nutricionales balanceadas, altas concentraciones pueden ser completamente degradadas en FMS, mencionando que las hidrofobinas podrían estar involucradas por su propiedad de adherir hifas a superficies hidrofóbicas tal como la matriz formada por el soporte inerte y el HXD. Sin embargo es difícil una comparación respecto a nuestro estudio ya que existen diferencias en el tipo de soporte, duración de las cinéticas y hongos utilizados.

### Expresión de la hidrofobina PLHYD en FML y FMS con n-hexadecano

La figura 5.2 muestra el gel de SDS-PAGE donde se observa que solo en la muestra de micelio producido con HXD en FMS hay una banda que corresponde a la hidrofobina PLHYD de *P. lilacinus*, previamente identificada en el micelio producido en un biofiltro fase gas utilizando tolueno como única fuente de carbono (Vigueras et al. 2008). El no encontrar la PLHYD en la muestra del micelio producido en FML sugiere que están en baja concentración o el hongo no la produce bajo esta condición.



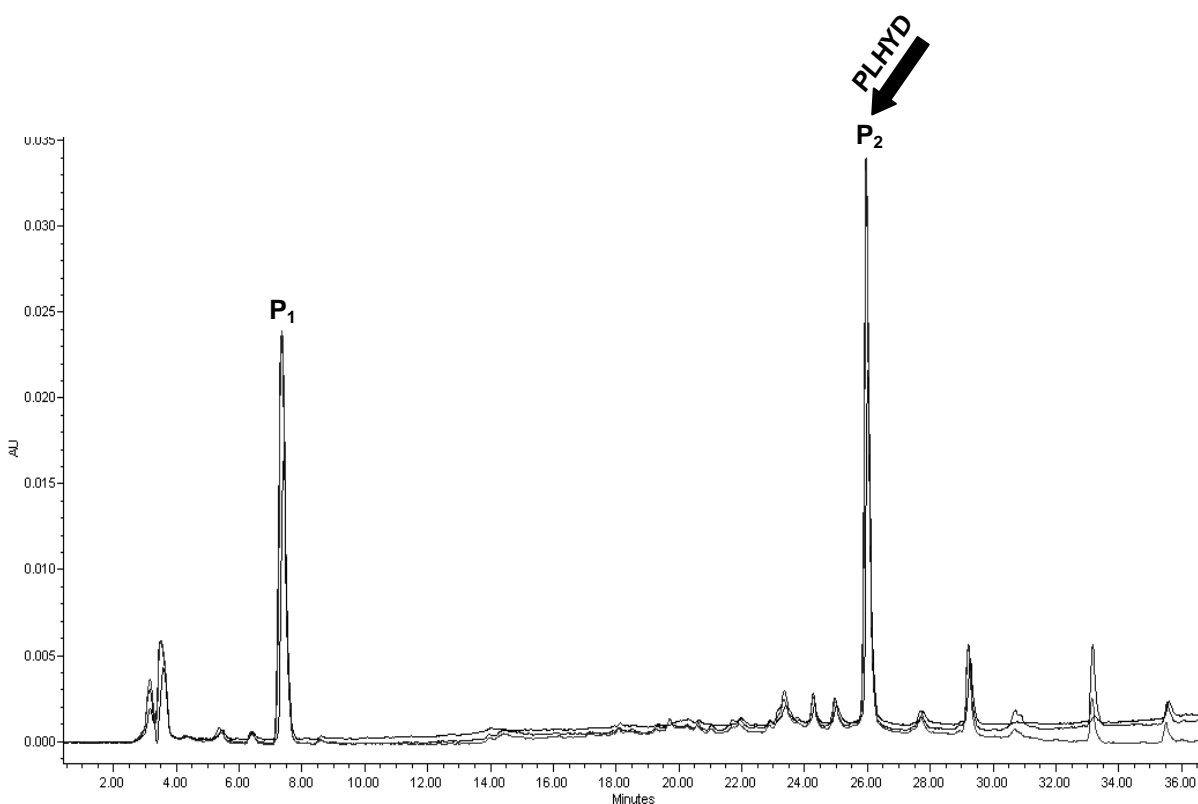
**Figura 5.2** Análisis de proteínas por HPLC-SEC y SDS-PAGE. Línea *M* estándar.

Línea 1 medio líquido. Línea 2 medio sólido.

Peñas et al. (2002) mencionaron que la expresión de hidrofobinas en FML puede diferir respecto al FMS, y que el metabolismo en ambas condiciones es diferente. Vergara-Fernández et al. (2006) reportaron un incrementó en la

hidrofobicidad superficial del micelio de *F. solani* cuando creció en medio sólido con sustratos hidrofóbicos, encontrando un aumento de lípidos que explica parcialmente las diferencias, sin embargo mencionan que posiblemente se favorece la producción de las hidrofobinas. Reciente Vigueras et al. (2009) mostraron que la hidrofobicidad superficial de *R. similis* y expresión de proteínas tipo hidrofobinas se modificó cuando creció con compuestos de polaridades opuestas, tal como el etanol ó n-hexano.

La figura 5.3 muestra el cromatograma del análisis por HPLC-RP de las proteínas extraídas del micelio producido en FMS con n-hexadecano.

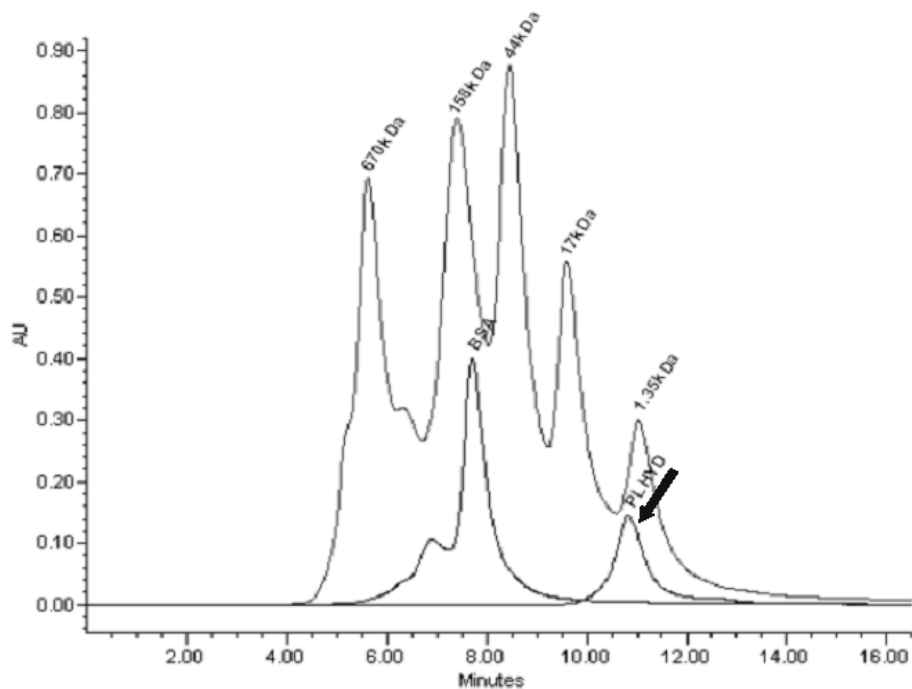


**Figura 5.3.** Separación por gradiente en HPLC-RP de proteínas extraídas del micelio producido en FMS con n-hexadecano, inyectadas por triplicado.

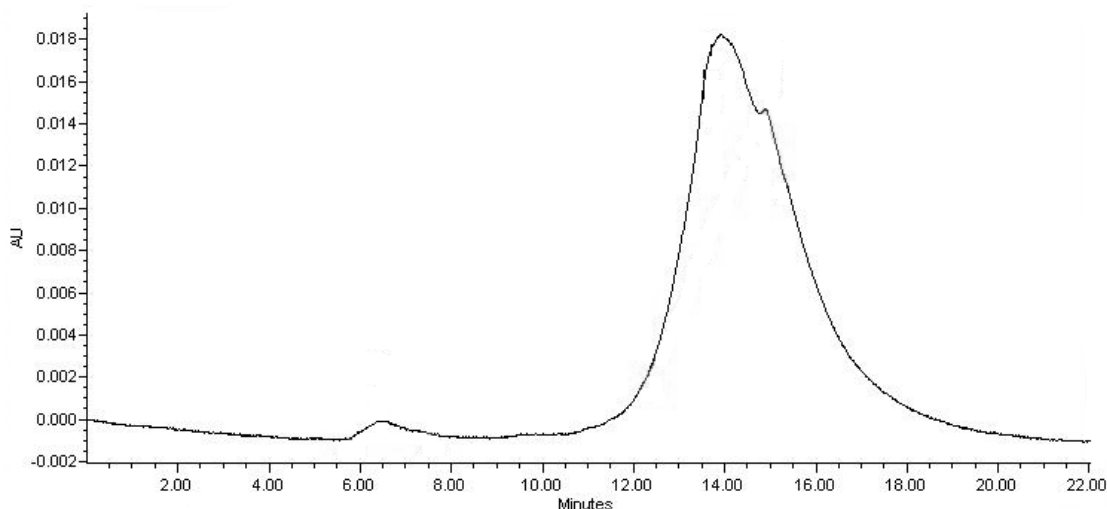
Dos picos intensos y bien definidos fueron detectados después de una elusión por gradiente con acetonitrilo, ambos picos (P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>) fueron colectados separadamente y liofilizados para su posterior análisis por HPLC-SEC y determinación de su actividad superficial sobre teflón. La hidrofobicidades de las proteínas de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>

son completamente diferentes, mientras las primeras eluyen con una baja concentración de acetonitrilo (29.8%), las segundas son más hidrofóbicas y requieren de un 62.7% de la fase orgánica para eluir en el gradiente del HPLC-RP. Tagu et al. (2000) reportaron que la hidrofobina HYDPt-1 de clase I eluyó con un 43% de acetonitrilo en el análisis de HPLC-RP, sin embargo la columna que utilizaron fue más corta (5 cm x 4.6 mm ID) y el gradiente ligeramente diferente. Comparando el área del pico P<sub>2</sub> respecto a la curva estándar de BSA se logró cuantificar la hidrofobina PLHYD por HPLC-RP (ver anexo A6).

En la figura 5.4 se muestra el cromatograma del análisis por HPLC-SEC del pico P<sub>2</sub>, donde se detectó la presencia de proteínas entre 17 y 1.35 kDa, que corresponde al peso molecular de la hidrofobina PLHYD. En la figura 5.5 se muestra el análisis del pico P<sub>1</sub>, donde se obtuvo una señal después de los 14 minutos, correspondientes a péptidos menores a 1.35 kDa, los cuales podrían ser producto de degradación, sin embargo es necesario realizar más estudios al respecto, ya que no existen reportes sobre la resistencia de las hidrofobinas al ataque proteolítico.



**Figura 5.4** HPLC-SEC de la fracción del pico P<sub>2</sub> separado por HPLC-RP. Se muestra el estándar de peso molecular y BSA utilizados para calibrar el sistema.



**Figura 5.5** HPLC-SEC de la fracción del pico P<sub>1</sub> separado por HPLC-RP.

La prueba de actividad superficial determinada como la capacidad de las proteínas para modificar el grado de hidrofobicidad (o humectabilidad) de una superficie hidrofóbica, mostró que la proteína del pico P<sub>2</sub> colectada del HPLC-RP fue capaz de modificar la hidrofobicidad superficial del teflón de 130.1 (±2)° a 60.0 (±5)° aun después de realizar lavados con SDS caliente. Este resultado es similar al reportado previamente por Viguera et al. (2008) donde una cubierta de la hidrofobina PLHYD de *P. lilacinus* sobre teflón disminuyó el ángulo de contacto de una gota de agua de 130.1 (±2)° a 57.0 (±5)°. La prueba con la proteína del pico P<sub>1</sub> fue negativa al no modificar la hidrofobicidad del teflón, mostrando que la proteína del pico P<sub>2</sub> es la que corresponde a la hidrofobina PLHYD. La presencia de esta hidrofobina clase I puede ser importante para la biodegradación fúngica de hidrocarburos sin embargo falta profundizar en estudios al respecto.

El rendimiento final de hidrofobina, 0.8 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>, recuperada del cultivo sólido con HXD fue menor al obtenido previamente en un biofiltro con tolueno, 1.1 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup> (Viguera et al. 2008). Ambos compuestos, HXD y tolueno, son no-polares con una constante dieléctrica baja (2.08 y 2.4, respectivamente). La recuperación de hidrofobinas de estos sistemas es de interés ya que existen potenciales aplicaciones de estas proteínas, p. ej. sobre superficies sólidas para la inmovilización de biosensores o en sistemas

líquidos de dos fases como biosurfactante (Wessels 1997; Wösten 2001; Scholtmeijer et al. 2001; Linder et al. 2005).

## 5.5 Conclusión

El nematófago *P. lilacinus* fue capaz de utilizar HXD como única fuente de carbono. El crecimiento del hongo fue mayor en medio líquido sin embargo la hidrofobina PLHYD de clase I sólo se encontró en medio sólido, sugiriendo que esta proteína se induce con el crecimiento aéreo del hongo. Existen otros reportes sobre la biodegradación de hidrocarburos aromáticos con este hongo, lo cual muestra su diversidad metabólica, que puede ser de interés por su potencial aplicación en procesos de tratamiento de la contaminación y la simultánea recuperación de productos de alto valor agregado, tal como la biomasa e hidrofobinas. Además la actividad biosurfactante de las hidrofobinas puede tener un importante rol en la solubilidad y transferencia de los hidrocarburos, pero es necesario realizar más trabajo al respecto.

## 5.6 Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACYT por la beca de doctorado de Gabriel Viguera y al Instituto de Ciencia y Tecnología del DF por financiar parte del viaje para el congreso Biotechniques for Air Pollution Control, Delft, The Netherlands.





# 6

## Discusión general y perspectivas

### Discusión general

En el estudio con *R. similis* realizado COV de polaridades extremas (capítulo 3) se obtuvieron CE de 74 g hexano m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, 230 g etanol m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> en biofiltros empacados con perlita. Mostrando una mayor hidrofobicidad superficial al crecer en n-hexano comparado con etanol y una diferente expresión de proteínas tipo hidrofobinas.

Posteriormente en el capítulo 4 se mostró que *P. lilacinus* fue capaz de crecer con tolueno como única fuente de carbono en un biofiltro de fase gas, obteniendo CE máximas de 50 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, y una ER de 53%. Del micelio producido en el biofiltro se logró purificar una hidrofobina de 10.6±0.3 kDa denominada PLHYD la cual fue identificada y parcialmente secuenciada por PMF. Con un rendimiento de 1.1 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>. Siendo este el primer reporte sobre la biodegradación de tolueno en un biofiltro de fase gas utilizando al hongo nematófago *P. lilacinus*, y la simultánea recuperación de una hidrofobina.

Finalmente en el capítulo 5 los resultados del estudio mostraron que *P. lilacinus* fue capaz de crecer en medio sólido y líquido utilizando HXD como única fuente de carbono. La Vmax de la actividad respiratoria fue mayor en FML que en FMS, 1.16 y 0.57 g CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. El rendimiento de hidrofobina en FMS, 0.8 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>, fue menor que el obtenido en el biofiltro de tolueno, sin embargo en FML la PLHYD no fue detectada. Lo cual sugiere que el tipo de cultivo tiene un efecto en la expresión de la hidrofobina clase I PLHYD, la cual

parece estar implicada en el crecimiento aéreo del hongo en FMS, así como en los biofiltros.

Peñas et al. (2002) mencionaron que la expresión de hidrofobinas en FML puede diferir respecto a la FMS. Por su parte Vergara-Fernández et al. (2006) reportaron un incremento en la hidrofobicidad superficial del micelio de *F. solani* al crecer en medio sólido con sustratos hidrofóbicos, y mencionan que posiblemente se favorecen la producción de las hidrofobinas. Mientras que los resultados del estudio realizado con *R. similis* (capítulo 3) mostraron que la hidrofobicidad superficial del hongo y la expresión de proteínas tipo hidrofobinas se modificó cuando creció con compuestos de polaridades opuestas, tal como el n-hexano ó etanol, lo cual pudo ser debido a diferencias en el metabolismo. Por lo tanto las diferencias en el tipo de cultivo, así como en el metabolismo, tienen un efecto en la expresión de las proteínas del tipo hidrofobinas. De hecho un mismo hongo puede tener múltiples genes codificando para diferentes tipos de hidrofobinas, que se expresan diferencialmente como respuesta a las etapas del desarrollo o condiciones ambientales (Askolin et al. 2006).

### **Conclusión general**

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el hongo *R. similis* es capaz de biodegradar COV de polaridades opuestas (n-hexano y etanol) en biofiltros de fase gas, encontrando que la polaridad de los sustratos tiene efecto sobre la hidrofobicidad superficial del hongo y expresión de moléculas tipo hidrofobinas; así como en el desempeño de los reactores; el etanol fue más fácilmente biodegradado que el n-hexano.

El hongo nematófago *P. lilacinus* fue capaz de biodegradar y utilizar como fuente de carbono tolueno (biofiltro de fase gas) y HXD (FMS y FML). Del micelio de *P. lilacinus* producido en el biofiltro se logró purificar e identificar la hidrofobina PLHYD, la cual mostró actividad superficial lo cual puede ser de interés para aplicaciones biotecnológicas. El rendimiento final de hidrofobina en el biofiltro con tolueno, 1.1 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>, fue mayor al obtenido en FMS con HXD, 0.8 mg PLHYD g biomasa<sup>-1</sup>, sin embargo en el FML la PLHYD no fue detectada. Sugiriendo

que la hidrofobina PLHYD, se encuentra implicada en el crecimiento aéreo del hongo en FMS y biofiltros.

La capacidad de *R. similis* y *P. lilacinus* para crecer utilizando hidrocarburos puede ser de interés para continuar estudios sobre la biodegradación de sustratos hidrofóbicos utilizando hongos filamentosos, sus sistemas enzimáticos o información genética. Por otro lado tanto la polaridad de los sustratos, así como el tipo de cultivo, tienen un efecto en la expresión de las proteínas del tipo hidrofobinas. Con lo cual este estudio contribuye a entender más sobre la respuesta fisiológica que tienen los hongos filamentosos al crecer en ambientes hidrofóbicos. El estudio también mostró que es posible recuperar productos de interés, tal como las proteínas hidrofobinas, a partir de la biomasa producida durante la biodegradación de hidrocarburos, lo cual puede añadir valor a estos procesos.

## Perspectivas

Es importante continuar los estudios sobre el tratamiento de contaminantes y recuperación de productos de interés como la biomasa o macromoléculas, a fin de añadir valor a estos procesos que son amigables con el medio ambiente. Por lo que ahora se debe mostrar esto de manera tangible, dirigiendo la investigación a incrementar las capacidades de biodegradación y los rendimientos de biomasa e hidrofobinas, así como evaluar la virulencia de *P. lilacinus* contra sus hospederos. La capacidad metabólica de *R. similis* para biodegradar diversos COV puede ser de interés para biodegradar mezclas de estos compuestos, además su información genética es valiosa ya que es posible extraerla y transferirla a microorganismos más seguros con el fin de producir algunas de sus enzimas que por síntesis química no sería posible obtener. Otra de las principales perspectivas del trabajo consiste en investigar y entender el rol de las hidrofobinas en la solubilidad y transferencia de los COV en los biofiltros fúngicos, mediante técnicas de biología molecular como el silenciamiento de genes, PCR tiempo real o proteómica. Por otro lado, se ha mencionado que la actividad biosurfactante de las hidrofobinas puede ser aprovechada para incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos, lo cual puede ser aplicado en procesos para el tratamiento de

contaminantes, sin embargo existen pocos trabajos al respecto. Aparte de las potenciales aplicaciones de las hidrofobinas en cosméticos, detergentes, shampoo, jabones, biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, entre otros, su eficiente actividad sobre superficies sólidas es de interés para adherir moléculas a superficies por las que normalmente no tienen afinidad, lo cual puede ser usado en biosensores o nanotecnología. Finalmente, también puede resultar interesante explorar sistemas de cultivo intermedios entre FML y FMS como son los biofiltros de lecho escurrido o tambores rotatorios que permitan un mayor control de la fuente de nitrógeno, pH, temperatura, entre otros.

# 7

## Referencias

- Abdelzaher H (2006)** Biological Control of Damping-off and Root Rot Diseases of Soybean Caused by *Pythium spinosum* Sawada var. *spinosum* Using Rhizosphere Species of *Aspergillus sulphureus*, *Penicillium islandicum* and *Paecilomyces variotii* Japanese Journal of Phytopathology. 72 (4):247-248
- Acuña M, Pérez F, Auria R, Revah S (1999)** Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. Biotechnol Bioeng 63:175-184
- Aizpuru A, Dunat B, Christen P, Auria R, García-Peña I, Revah S (2005)** Fungal biofiltration of toluene on ceramic rings. J Environ Eng 13: 396-402
- Arriaga S, Revah S (2005a)** Removal of n-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32:548-553
- Arriaga S, Revah S (2005b)** Improving n-hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. Biotechnol Bioeng 90:107-115
- Arriaga S, Muñoz R, Hernández S, Guieysse B and Revah S (2006)** Gaseous hexane biodegradation by *Fusarium solani* in two liquid phase packed-bed and stirred-tank bioreactors. Environ. Sci. Technol. 40:2390-2395
- Arriaga S. (2009)** Coupling methanol vapors aerobic biodegradation with heterologous protein expression of endochitinase Ech42 from *Trichoderma atroviride* in *Pichia pastoris* 3rd International Congress Biotechniques for Air Pollution Control. Delft, The Netherlands. In: Proc

**Ásgeirsdóttir S, de Vries O and Wessels J (1998)** Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). Microbiology 144:2961-2969.

**Askolin S, Nakari-Setälä T, Tenkanen M (2001)** Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. Appl Microbiol Biotechnol 57:124–130

**Askolin S, Linder M, Scholtmeijer K, Tenkanen M, Penttilä M, de Vocht M Wösten H (2006)** Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. Biomacromolecules 7:1295-13

**Auria R, Frere G, Morales M, Acuña ME, Revah S (2000)** Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. Biotechnol Bioeng 68:448–451

**Bai G, Brusseau M, Miller R (1997)** Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. Journal of Contaminant Hydrology. 25:157-170.

**Bilewicz R, Witomski J, Van der Heyden A, Tagu D, Palin B and Rogalska E (2001)** Modification of electrodes with self-assembled hydrophobin layers. J. Phys. Chem. 105:9772-9777.

**Bolívar-Zapata F. 2002** (coordinador general). “Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI”. Retos y oportunidades. CONACYT y Fondo de Cultura Económica. 187-207.

**Bouchez -Naïtali M, Rakatozafy H, Marchal R, Leveau J, Vandecasteele J (1999)** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. J Appl Microbiol. 86:421-428

**Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54

**Carpenter C, Mueller R, Kazmierczak P, Zhang L, Villalon D and van Alfen N (1992)** Effect of virus on accumulation of a tissue-specific cell surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. Mol. Plant Microbe Interact. 4:55-61.

- Christen P, Domenech, Michelena G, Auria R, Revah S (2001)** Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with *Candida utilis*. J Haz Mat 89:253-265
- Corvis Y, Walcarius A, Rink R, Mrabet N and Rogalska E (2005)** Preparing catalytic surfaces for sensing applications by immobilizing enzymes via hydrophobin layers. Anal. Chem. 77:1622-1630.
- Cofone L, Walker J, Cooney J (1973)** Utilization of hydrocarbons by *Cladosporium resinae*. J. Gen. Microbiol. 76:243–246.
- Cox H, Houtman J, Doddema H and Harder W (1993)** Enrichment of fungi and degradation of styrene in biofilters. Biotechnol Lett 15:737–742.
- Cox H, Magielsen F, Doddema H and Harder W (1996)** Influence of the water content and water activity on styrene degradation by *Exophiala jeanselmei* in biofilters. Appl Microbiol Biotechnol 45:851–856.
- Cox H, Moerman R, van Baalen S, van Heiningen W, Doddema H and Harder W (1997)** Performance of a styrene degrading biofilter containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. Biotechnol Bioeng 53:259–266.
- Crespo R, Juarez M, Dal Bello G, Padín S, Calderón G, and Pedrini N (2002)** Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. Biocontrol 47: 685-698.
- Davies J, Wellman A, Zajic J (1973)** Hyphomycetes utilizing natural gas. Can. J. Microbiol. 19:81–85.
- de Groot P, Schaap P, Sonnenberg A, Visser J and van Griensven L (1996)** The *Agaricus biosporus hypA* gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. J. Mol. Biol. 257:1008-1018
- de Hoog G and Guarro J (2000)** Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn/Reus.
- Desai J, Banat I (1997)** Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol Mol Biol Rev. 61:47-64.

**Deshusses M, Johnson C (2000)** Development and validation of a simple protocol to rapidly determine the performance of biofilters for VOC treatment. *Environ Sci Technol* 34:461-467

**Deviny J, Deshusses M, Webster T (1999)** *Biofiltration for Air Pollution Control*, FL: Lewis Publishers/CRC. Press. 6-20.

**de Gennes P (1985)** Wetting: statics and dynamics. *Rev Mod Phys* 57:827-863

**de Vocht M, Reviakine I, Wösten H, Brisson A, Wessels J and Robillard G (2000)** Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. *J. Biol. Chem.* 275:28428-28432.

**de Vocht M, Scholtmeijer K, van der Vegte E, de Vries O, Sonveaux N, Wösten H, Ruyschaert J, Hadziioanno u G, Wessels J and Robillard G (1998)** Structural characterization of the hydrophobin SC3, as a monomeric and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophys. J.* 74:2059.2068.

**Doss R, Potter S, Chastagner G, Christian J (1993)** Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl Environ Microbiol* 59:1786–1791

**Estévez E, Veiga MC, Kennes C (2005)** Biofiltration of waste gases with the fungi *Exophiala oligosperma* and *Paecilomyces variotii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:563–568

**García-Peña I. 2002.** Biodegradación de tolueno con *Scedosporium apiospermum*. metabolismo y su relación en el funcionamiento de un biofiltro. Tesis Doctorado UAM-I.

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

**García-Peña E, Hernández S., Auria R., Revah S. (2005)** Correlation between biological activity and reactor performance in the biofiltration of toluene with the fungus *Paecilomyces variotii* CBS 115145. *Appl. Environm. Microbiol.* 71:4280-4285

**García-Peña E, Ortiz I , Hernández S, Revah S (2008)** Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. 62:442-447



- Gunsch C, Kinney K, Szaniszlo P, Whitman C (2007)** Relative Gene Expression Quantification in a Fungal Gas-Phase Biofilter. *Biotechnol Bioeng.* 98(1):101-111.
- Gesell M, Hammer E, Specht M, Francke W (2001)** Biotransformation of biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. *Appl Environ Microbiol* 67(4):1551–1557
- Gesell M, Hammer E, Mikolasch A, Schauer F (2004)** Oxidation and ring cleavage of dibenzofuran by the filamentous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Arch Microbiol* 182:51–59
- Goller S, Schoisswohl D, Baron M, Parriche M, and Kubicek C (1998)** Role of Endoproteolytic Dibasic Proprotein Processing in Maturation of Secretory Proteins in *Trichoderma reesei* *Appl Environ Microbiol* 3202–3208
- Graham D, Smith V, Cleland D, Law K (1999)** Effects of nitrogen and phosphorous supply on hexadecane biodegradation in soil systems. *Water Air Soil Pollut.* 111:1–18.
- Hasegawa Y, Okamoto T, Obata H, Tokuyama T (1999)** Utilization of aromatic compounds by *Trichosporon cutaneum* KUY-6A. *J. Ferment. Bioengineer.* 69:122–124.
- Hardison L, Curry S, Ciuffetti L, Hyman M (1997)** Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl tertbutyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3059–3067.
- Hegedus D, Bidochka J, Miranpuri G, Khachatourians G (1992)** A comparison of the virulence, stability and cell-wall surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36:785–789
- Hofrichter M, Bublitz F, Fritsche W (1995)** Cometabolic degradation of *o*-cresol and 2,6-dimethylphenol by *Penicillium frequentans* Bi 7/2. *J. Basic Microbiol.* 35:303–313.
- Inakollu S, H-Ch Hung, Shreve G (2004)** Biosurfactant enhancement of microbial degradation of various structural classes of hydrocarbon in mixed waste systems, *Environ. Eng. Sci.* 21(4):463–469.
- Ishikawa H, Kita Y, Horikoshi K (1980)** US Patent 4225381.

**Janssen M, van Leeuwen M, van Kooten T, de Vries J, Dijkhuizen L and Wösten H (2004)** Promotion of fibroblast activity by coating with hydrophobins in the  $\beta$ -sheet end state. *Biomaterials* 25:2731-2739.

**Jones K, Trudgill P, Hopper D (1993)** Metabolism of p-cresol by the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1125–1130.

**Kwan A, Macindoe I, Vukašin P, Morris V, Kass I, Gupte R, Mark A, Templeton M, Mackay J and Sunde M (2008)** The Cys3–Cys4 Loop of the Hydrophobin EAS Is Not Required for Rodlet Formation and Surface Activity. *J. Mol. Biol.* 382:708-720

**Kennes C, Veiga M (2004)** Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *J Biotechnol* 113:305-319

**Koch A, Käppeli O, Fiechter A and Reiser J (1991)** Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol.* 173(13):4212-4219

**Kleemola T, Nakari-Setälä T, Linder M, Penttilä M, Kotaviita E, Olkku J and Haikara A (2001)** Characterisation and detection of the gushing factors produced by fungi. In: *Proc. E.B.C. 28th Congr., Budapest.* 1-10.

**Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685

**Lahtinen T, Linder M, Nakari-Setälä T, Oker-Blom C (2008)** Hydrophobin (HFBI): A potential fusion partner for one-step purification of recombinant proteins from insect cells. *Protein Expression and Purification.* 59:18-24

**Lema R y Roca B. 1998.** Biorreactores no convencionales. En *Ingeniería Bioquímica*, Editorial Síntesis. 189-214.

**Linder M, Szilvay G, Nakari-Setälä T, Söderlund H and Penttilä M (2002)** Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins FBI and HFBI from *Trichoderma reesei*. *Protein Sci.* 11:2257-2266.

**Linder M, Szilvay G, Nakari-Setälä T, Penttilä M (2005)** Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microb Rev* 29:877-896

**Lindley N, Heydeman M (1983)** Uptake of vapour phase [<sup>14</sup>C] dodecane by whole mycelia of *Cladosporium resinae*. *J. Gen. Microbiol.* 129:2301–2305.

- Lizuka M y Nicod C (2000)** Conciencia ciudadana y contaminación atmosférica: estado de situación en la ciudad de Santiago de Chile (LC/R.2022), Santiago de Chile, Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). p. 136-167.
- López L, Hans Börje J (2001)** Biodiversidad del suelo: control biológico de nemátodos fitopatógenos por hongos nematófagos. Cuaderno de Biodiversidad. 6:12-15
- Lugones L, Wösten H, Wessels J (1998)** A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). Microbiology 144:2345–2353
- Lumsdon S, Green J and Stieglitz B (2005)** Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. Colloids Surf. 44:172-178.
- Marín-Cervantes M (2006)** Evaluación de la actividad quitinolítica y expresión de hidrofobinas de cepas de *Lecanicillium* en medios hidrófobos utilizando compuestos orgánicos volátiles. Tesis Maestría UAM-I.
- Martijn F, Claessen D, Barend B, Lubbert D; Wösten H. 2005.** Amyloids a functional coat for microorganisms. Nature reviews. Microbiology. 3(4):333-41.
- Martin F (2000)** Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. New Phytol 149:127–135
- Mey G, Correia T, Oeser B, Kershaw M, Garre V, Arntz C, Talbot N, Tudzynski P (2003)** Structural and functional analysis of an oligomeric hydrophobin gene from *Claviceps purpurea*. Mol Plant Pathol. 4:31-41.
- Meza J, Lomascolo A, Casalot L, Sigoillot J, Auria R (2005)** Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: influence of ethanol vapours as inducer. Process Biochem 40:3365–337
- Middelhoven W, Scorzetti G, Fell J (1999)** *Trichosporon guehoae* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. Can. J. Microbiol. 45:686–690.
- Middelhoven W, Scorzetti G, Fell J (2000)** *Trichosporon veenhuisii* sp. nov., an alkane-assimilating anamorphic basidiomycetous yeast. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:381–387.

**Milstein O, Vered Y, Shragina L, Gressel J, Flowers H, H'uttermann A (1983)** Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus*. Arch. Microbiol. 135:147–154.

**Moe W and Qi B (2004)** Performance of a fungal biofilter treating gas-phase solvent mixtures during intermittent loading. Water Research. 38:2259-2268.

**Mohseni M, Allen D (2000)** Biofiltration of mixtures of hydrophilic and hydrophobic volatile organic compounds. Chem Eng Sci 55:1545-1558

**Morales M, Hernández S, Revah S, Auria R. 1998.** Modeling drying process on biofiltration. In: Proc 1998 Air Waste Management Association's 91st Annual Meeting & Exhibition San Diego, CA. June 14–18, 1998.

**Muñoz G, Nakari-Setälä T, Agosin E, Penttilä M (1997)** Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Curr Genet 32:225–230

**Nakari-Setälä T, Aro N, Kalkkinen N, Alatalo E and Penttilä M (1996)** Genetic and biochemical characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. Eur. J. Biochem. 235:248-255.

**Nakari-Setälä, T, Aro, N., Ilmen, M., Kalkkinen, N. and Penttilä, M (1997)** Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*, Cloning and characterization of the *hfb2* gene. Eur. J. Biochem. 248:415-423.

**Nakari-Setälä, T., Azeredo, J., Henriques, M., Oliveira, R., Teixeira, J., Linder, M and Penttilä, M (2002)** Expression of a fungal hydrophobin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: effect on cell surface properties and immobilization. Appl. Environ. Microbiol. 68:3385-3391.

**Napolitano R, Juárez M (1997)** Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. Arch Biochem Biophys 344:208–214

**Neujahr, H.Y., Varga, J.M. (1970)** Degradation of phenols by intact cells and cell-free preparations of *Trichosporon cutaneum*. Eur. J. Biochem. 13, 37–44.

**Nguyen V, Oh I, Kim Y, Kim K, Kim Y, Park R (2009)** Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG-3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs. J Ind Microbiol Biotechnol 36:195–203

- Noordman W, Wachter J, de Boer G, Janssen D (2002)** The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*. 94:195-212
- Onodera, M., Endo, Y., Ogasawara, N. (1989)** Utilization of short chain hydrocarbons and accumulation of methylketones by a gaseous hydrocarbon assimilating mold, *Scedosporium* sp. A-4. *Agric. Biol. Chem.* 53:1431–1432.
- Ottengraf SPP, van Den Oever AHC. 1983.** Kinetics of organic compound removal from waste gases with biological filter. *Biotechnol Bioeng* 25(12):3089-3102.
- Paananen A, Vuorimaa E, Torkkeli M, Penttilä M, Kauranen M, Ikkala O, Lemmetyinen H, Serimaa R and Linder M (2003)** Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry* 42:5253-5258.
- Palomo J, Peñas M, Fernández-Lorente G, Pisabarro A, Fernández-Lafuente R, Ramírez L and Guisán J (2003)** Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. *Biomacromolecules* 4:204-210.
- Prenafeta-Boldu F, Kuhn A, Luykx D, Anke H, van Groenestijn W, de Bont J (2001)** Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycol* 105:477-484
- Prenafeta-Boldu F. X., Richard Summerbell y G. Sybren de Hoog. 2005** Fungi growing mononaromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol.* 1–22
- Pedrini N, Juárez M, Crespo R, de Alaniz M (2006)** Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. *Mycol.* 98:528–534.
- Peñas M, Rust B, Larraya L, Ramírez L and Pisabarro A (2002)** Differentially regulated, vegetative-mycelium-specific hydrophobins of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3891-3898.
- Quintero R (1981)** Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicaciones. Alambra Mexicana.

**Revah S, Morgan-Sagastume J (2005)** Methods of odor and VOC control. In: Shareefdeen Z, Singh A (eds) Biotechnology for odor and air pollution control. Springer, Berlin. 29–63

**Ron E and Rosengberg E (2002)** Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:249-252.

**Ryabkin M, Smirnov V, Vinarov A (2001)** Removal of compounds in the phenolformaldehyde series from a gas/air stream by biofiltration. *Chem Petrol Eng* 37:246-252

**Salanitro J (2001)** Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. *Advances in Agronomy*. 72:53-105.

**Sarlin T, Nakari-Setälä T, Linder M, Penttilä M, Haikara A (2005)** Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *J Inst Brew* 111:105–111

**Sakaguchi K, Kurane R, Murata M (1975)** Assimilation of formaldehyde and other C1-compounds by *Gliocladium deliquescens* and *Paecilomyces varioti*. *Agr. Biol. Chem.* 39:1695–1702.

**Sadek M, Ghazala B, Athman G and Califa H (2003)** Effect of some fungal isolates on egg hatching inhibition of root knot nematodes *Meloidogyne* spp. under laboratory conditions. Eighth Arab Congress of Plant Protection, El-Beida, Libya

**Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996)** Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850–858

**Scholtmeijer K, Wessels J, Wösten H (2001)** Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:1–8

**Scow K, Li D, Manilal V, Alexander M (1990)** Mineralization of organic compounds at low concentrations by filamentous fungi. *Mycol. Res.* 94:793–798.

**Selber K, Tjerneld F, Collén A, Hyytiä T, Nakari-Setälä T, Bailey M, Fagerström R, Kan J, van der Laan J, Penttilä M and Kula M (2004)** Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. *Process Biochem.* 39:889-896.

- Serimaa R, Torkkeli M, Paananen A, Linder M, Kisko K, Knaapila M, Ikkala O, Vuorimaa E, Lemmetyinen H and Seeck O (2003)** Self-assembled structures of hydrophobins HFBI and HFBII. *J. Appl. Cryst.* 36:499-502
- Spigno G, Pagella C, Fumi M, Molteni R, De Faveri D (2003)** VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chem Eng Sci* 58:739-746
- Spigno G and DM De Faveri (2005)** Modeling of a vapor-phase fungi bioreactor for the abatement of hexane: fluid dynamics and kinetic aspects. *Biotechnology Bioengineering.* 89(3):319-328.
- Stirling G (1991).** *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes.* UK: CABI Publishing. 282.
- Simon D, Atkins I, Clark S, Penny R, Brian R (2005)** The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus* *FEMS Microbiology Ecology* 51:257–264
- Smits T, Wick L, Harms H, Keel C (2003)** Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. *Environ Microbiol* 5:85-91
- Sosa-Gomez D, Boucias D, Nation J (1997)** Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J Invertebr Pathol* 69:31–39
- Tagu D, De Bellis R, Balestrini R, De Vries O, Piccoli G, Stocchi V, Bonfante P, Martin F (2000)** Immunolocalization of hydrophobin HYDPt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytol* 149:127–135
- Takai S and Richards W (1978)** Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: Isolation and some properties of cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. *Phytopath. Z.* 91:129-146.
- van Groenestijn J, Liu J (2002)** Removal of alpha-pinene from gases using biofilters containing fungi. *Atmos Environ* 35:5501-5508
- Vesilind PA, Perirce J, Weiner RF. 1990.** *Environmental Pollution and Control.* 4a Ed. Butterworth-Heinemann. p.249.

**Vergara-Fernández A, Van Haaren B, Revah S (2006)** Phase partition of gaseous hexane and surface hydrophobicity of *Fusarium solani* when grown in liquid and solid media with hexanol and hexane. *Biotechnol Lett* 28:2011-2017

**Vergara-Fernández A, Hernández S, Revah S (2008)** Phenomenological model of fungal biofilters for the abatement of hydrophobic VOCs. *Biotechnol Bioeng* 101:1182-1192

**Vigueras G, Shirai K, Martins D, Franco T, Fleuri L, Revah S (2008)** Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:147-154

**Vigueras G, Arriaga S, Shirai K, Morales M and Revah S (2009)** Hydrophobic response of the fungus *Rhinoctadiella similis* in the biofiltration with volatile organic compounds with different polarity. *Biotechnol Lett.* 31:1203–1209.

**Vigueras G, Shirai K, Morales M, Revah S (2009)** Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* for biomass production and recovery of a hydrophobin protein. 3rd International Congress Biotechniques for Air Pollution Control. Delft, The Netherlands. In: Proc 112-117

**Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar C, Romero-Gómez S, Díaz-Godínez G, Augur C (2003)** Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J* 13:157–167.

**Volke-Sepúlveda T, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E (2003)** Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.* 87:81–86.

**Volke-Sepúlveda T, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E (2006)** Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technol.* 97:1583–1591

**Wang X, Shi F, Wösten H, Hektor H, Poolman B and Robillard G (2005)** The SC3 Hydrophobin Self-Assembles into a Membrane with Distinct Mass Transfer Properties. *Biophys. J.* 88:3434-3443.

**Wessels J (1997)** Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol* 38:1-45



- Weber F, Hage K and de Bont J (1995)** Growth of the fungus *Cladosporium sphaerospermum* with toluene as the sole carbon and energy source. *Appl Environ Microbiol* 61: 3562–3566.
- Weber F, Hartmans S. (1997)** Prevention of clogging in a biological trickle-bed reactor removing toluene from contaminated air. *Biotechnology and Bioengineering*. 50:91-97
- Wösten H, Schuren F, Wessels J (1994)** Interfacial self assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J* 13:848–854
- Wösten H and Wessels J (1997)** Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience* 38:363-374.
- Wösten H, van Wetter M, Lugones L, van der Mei H, Busscher H, Wessels J (1999)** How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr Biol* 9:85–88
- Wösten H and de Vocht M (2000)** Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta* 1469:79.86.
- Wösten H (2001)** Hydrophobins: multipurpose proteins. *Ann Rev Microbiol* 55:625-646
- Wohlleben W, Subkowski T, Bollschweiler C, von Vacano B, Liu Y, Schrepp W, Baus U (2009)** Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *Eur Biophys J*. Epub ahead of print.
- Woertz J, Kinney K, McIntosh N, Szaniszlo P (2001)** Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing the strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. *Biotechnol Bioeng* 75:550–558
- Woertz J, van Heiningen W, van Eeckert M, Kraakman N, Kinney K, van Groenestijn J (2002)** Dynamic bioreactor operation: effects of packing material and mite predation on toluene removal from off-gas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:690–694.
- Wessels J (1994)** Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:413-437

**Ying S, Feng M (2004)** Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *J Appl Microbiol* 97:323–331

**Zhang L, Villalon D, Sun Y, Kazmierczak P and van Alfen N (1994)** Virus-associated down-regulation of the gene encoding cryparin, an abundant cell-surface protein from the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Gene* 139:59.64.

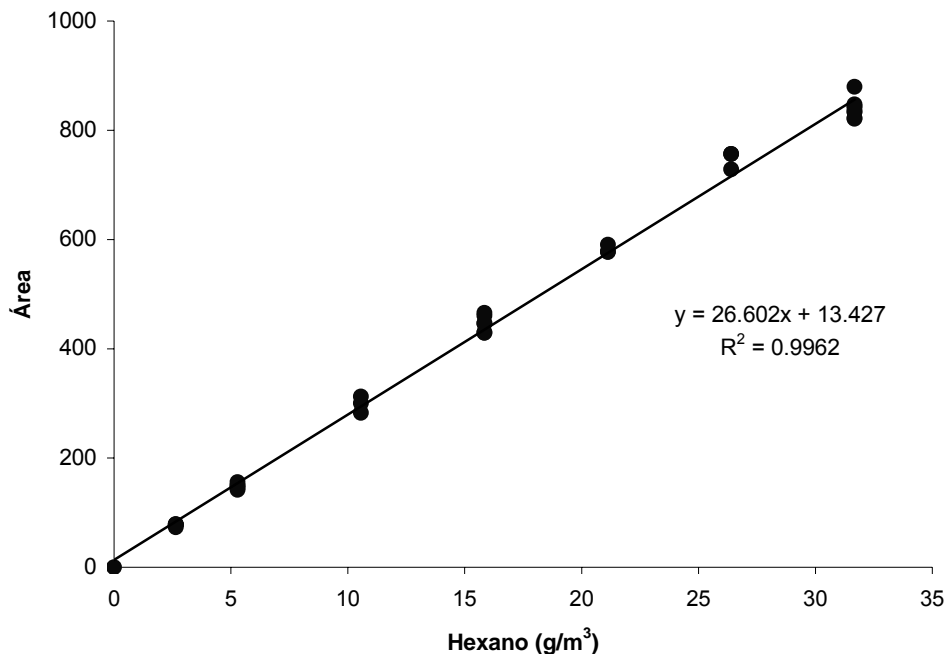
**Zilli M, Converti A, Lodi A, Del Borgui M, Ferraiolo G (1993)** Phenol removal from waste gases with a biological filter by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng* 41:693-699

[http://www.freepatentsonline.com/result.html?p=1&srch=xprtsrch&query\\_txt=hydrophobin&uspat=on&usapp=on&eupat=on&jp=on&pct=on&date\\_range=all&stemming=on&sort=relevance](http://www.freepatentsonline.com/result.html?p=1&srch=xprtsrch&query_txt=hydrophobin&uspat=on&usapp=on&eupat=on&jp=on&pct=on&date_range=all&stemming=on&sort=relevance)

# 8

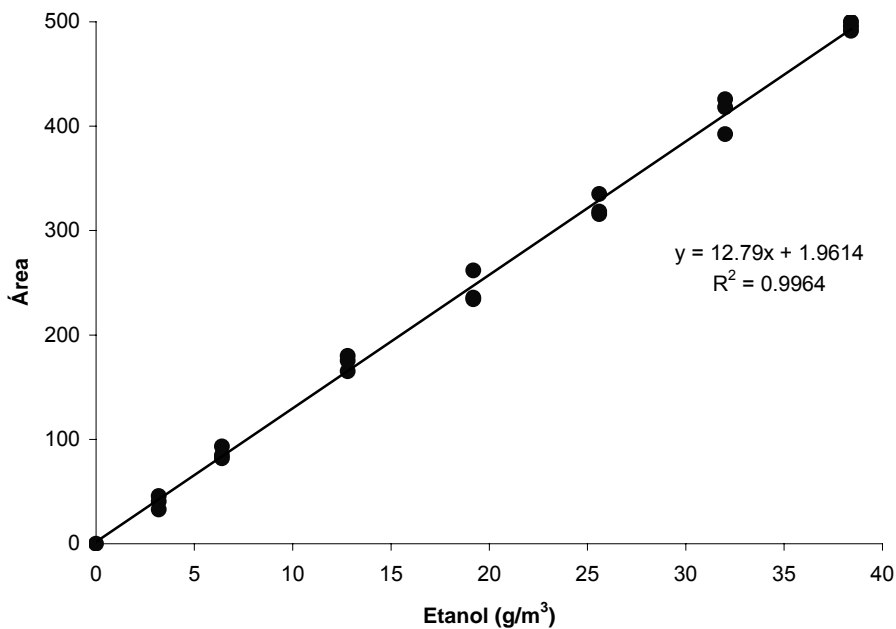
## Anexos

**A1. Curva estándar para determinar la concentración de hexano en fase gas.**

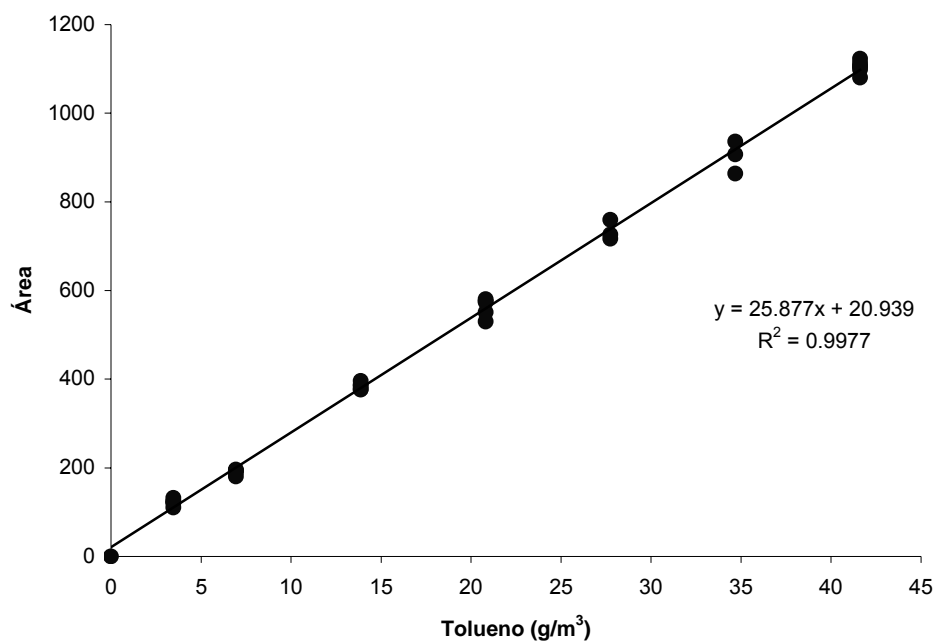


**Figura A1.** Curva estándar de hexano determinada por CG-FID.

**A2. Curva estándar para determinar la concentración de etanol en fase gas.**



**Figura A2.** Curva estándar de etanol determinada por CG-FID.

**A3. Curva estándar para determinar la concentración de tolueno en fase gas.****Figura A3.** Curva estándar de tolueno determinada por CG-FID.

**A4. Curva estándar para determinar la concentración de CO<sub>2</sub> en fase gas.**

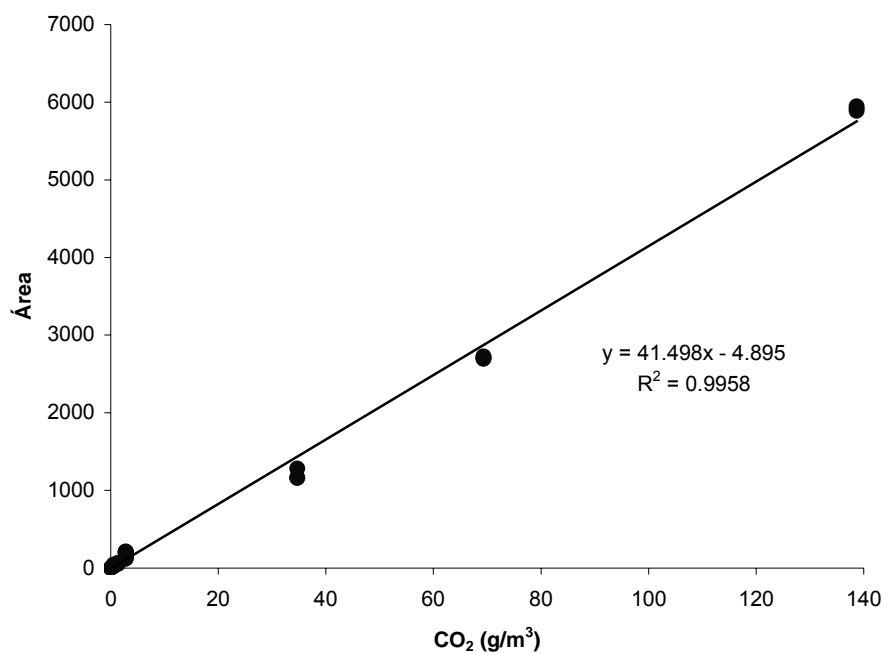
$$C_{CO_2} = \left( \frac{A_{CO_2}}{A_{total}} \right) Fc$$

$C_{CO_2}$  = concentración de CO<sub>2</sub>

$A_{CO_2}$  = Área de CO<sub>2</sub>

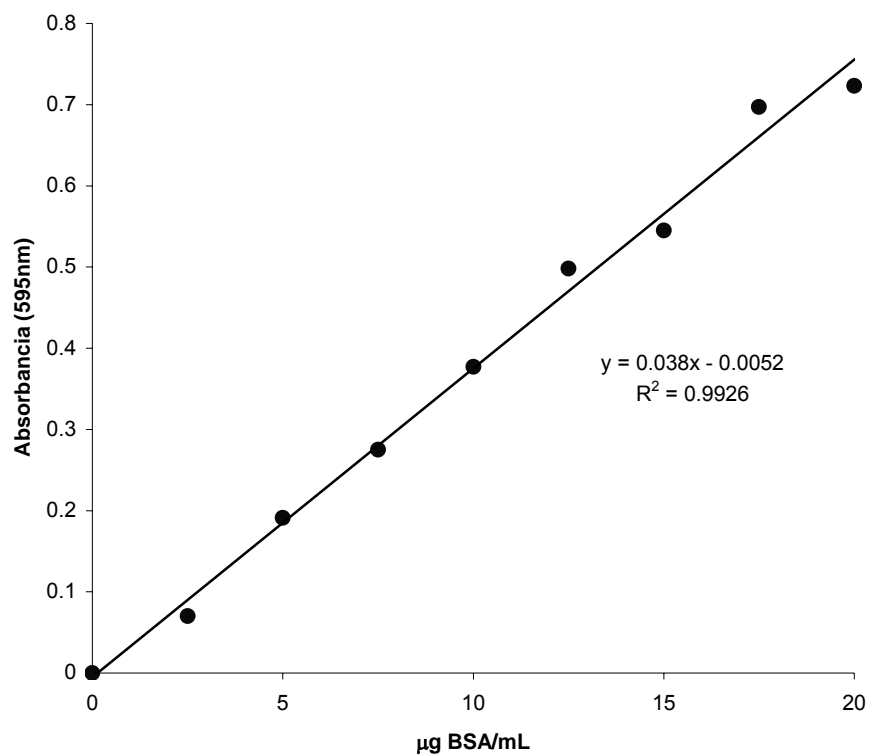
$A_{total}$  = Área de CO<sub>2</sub> + Área de N<sub>2</sub>

donde el factor de corrección  $Fc = 1200.54 \text{ g m}^{-3}$



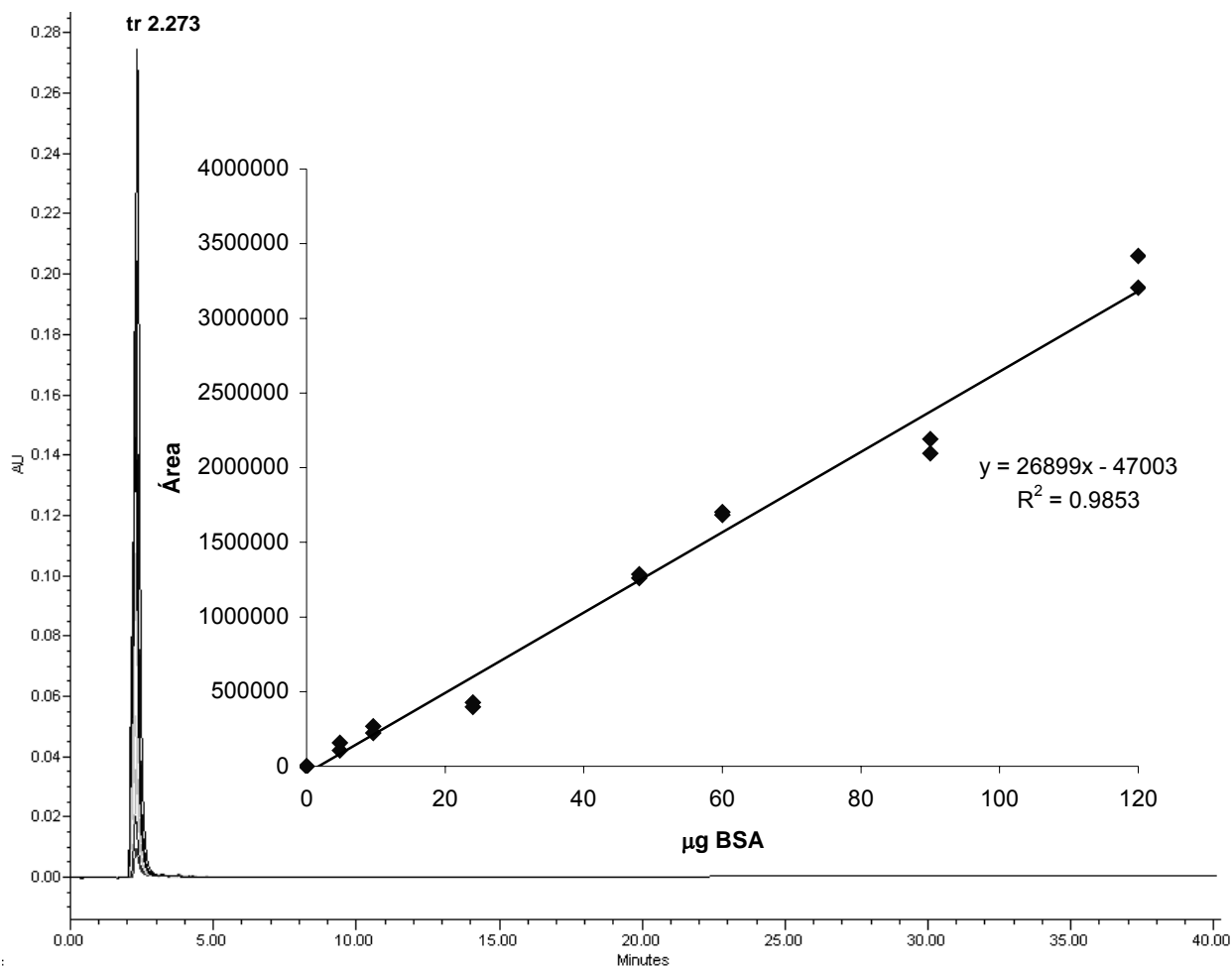
**Figura A4.** Curva estándar de CO<sub>2</sub> determinada por CG-TCD.

**A5. Curva estándar para determinar la concentración de proteína por espectrofotometría.**



**Figura A5.** Curva estándar de proteína BSA determinada por Bradford

**A6. Curva estándar para determinar la concentración de proteína por HPLC-RP.**



**Figura A6.** Curva estándar de proteína BSA determinada por HPLC-RP, el tr promedio se muestra encima de los picos.



### A7. Análisis estadístico de la hidrofobicidad superficial de *R. similis* crecido con etanol, n-hexano o glucosa; y controles abióticos.

Los datos del ángulo de contacto de los controles y los tres tratamientos son analizados como un diseño completamente aleatorizado (DCA), siendo los tratamientos hexano, etanol y glucosa, utilizando como controles vidrio, parafilm y teflón, para lo cual se plantea la siguiente hipótesis:

#### Hipótesis:

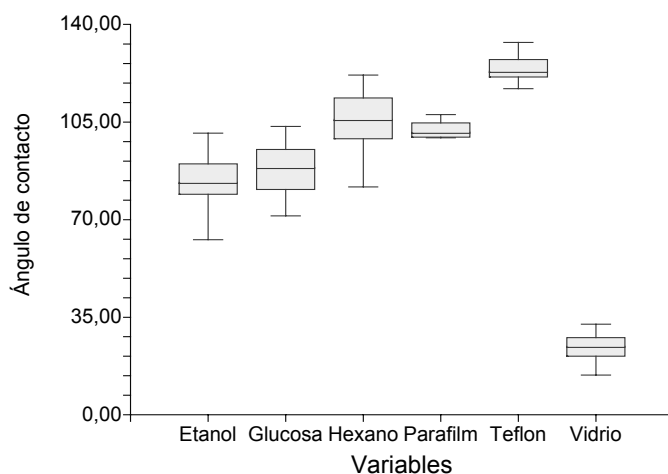
Ho:  $\mu_{Vidrio} = \mu_{Parafilm} = \mu_{Teflon} = \mu_{Hexano} = \mu_{Etanol} = \mu_{Glucosa}$  (en promedio las seis superficies producen la misma respuesta)

Ha: no todas las  $\mu$  son iguales (al menos una condición produce una respuesta promedio diferente del promedio de cuando menos una de las demás condiciones)

**Nota:** Después del analizar los datos como un DBCA, se determino que el tipo de membrana no tiene efecto sobre la variable respuesta. Por lo tanto se utilizan en conjunto todos los datos para analizar solamente el efecto que produce el tratamiento y encontrar las diferencias.

#### Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0,05)
Skewness Normality of Residuals	-1,5696	0,116497	Accept
Kurtosis Normality of Residuals	1,0649	0,286938	Accept
Omnibus Normality of Residuals	3,5977	0,165487	Accept
Modified-Levene Equal-Variance Test	8,1217	0,000001	Reject



**Figura A7.** Diagrama de caja la hidrofobicidad superficial de *R. similis* crecido con etanol, n-hexano o glucosa; y controles abióticos.

**Analysis of Variance Table**

Source Term (Alpha=0,05)	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A ( ... )	5	141084,7	28216,94	497,61	0,000000*	1,000000
S(A)	195	11057,47	56,70497			
Total (Adjusted)	200	152142,2				
Total	201					

\* Term significant at alpha = 0,05

**Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on Ranks**

**Hypotheses**

Ho: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

**Test Results**

Method	DF	Chi-Square (H)	Prob Level	Decision(0,05)
Not Corrected for Ties	5	161,9341	0,000000	Reject Ho
Corrected for Ties	5	161,9404	0,000000	Reject Ho
Number Sets of Ties	21			
Multiplicity Factor	312			

**Group Detail**

Group	Count	Sum of Ranks	Mean Rank	Z-Value	Median
Etanol	41	2626,50	64,06	-4,5576	83,35
Glucosa	46	3524,50	76,62	-3,2372	88,68
Hexano	46	6582,50	143,10	5,5897	105,92
Parafilm	23	3115,00	135,43	3,0169	101,31
Teflon	22	4176,50	189,84	7,5912	123,15
Vidrio	23	276,00	12,00	-7,7976	24,56

**Duncan's Multiple-Comparison Test**

Response: Etanol,Glucosa,Hexano,Parafilm,Teflon,Vidrio

Term A:

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=195 MSE=56,70497

Group	Count	Mean	Different From Groups
Vidrio	23	24,30609	Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano, Teflon
Etanol	41	84,00536	Vidrio, Glucosa, Parafilm, Hexano, Teflon
Glucosa	46	87,95435	Vidrio, Etanol, Parafilm, Hexano, Teflon
Parafilm	23	102,187	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Hexano	46	105,5298	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Teflon	22	124,18	Vidrio, Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means. According to Hsu(1996, page 130), the specified family-wise error rate (alpha) is overstated and the Tukey-Kramer method is recommended instead.

### Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Etanol, Glucosa, Hexano, Parafilm, Teflon, Vidrio  
Term A:

Alpha=0,050 Error Term=S(A) DF=195 MSE=56,70497 Critical Value=4,0705

Group	Count	Mean	Different From Groups
Vidrio	23	24,30609	Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano, Teflon
Etanol	41	84,00536	Vidrio, Parafilm, Hexano, Teflon
Glucosa	46	87,95435	Vidrio, Parafilm, Hexano, Teflon
Parafilm	23	102,187	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Hexano	46	105,5298	Vidrio, Etanol, Glucosa, Teflon
Teflon	22	124,18	Vidrio, Etanol, Glucosa, Parafilm, Hexano

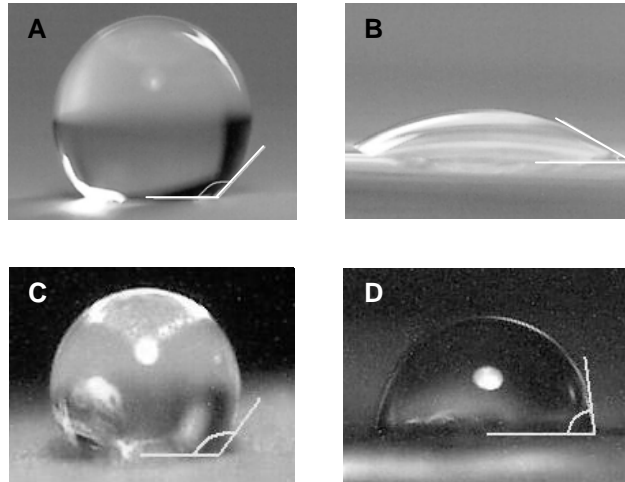
Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

### Conclusiones estadísticas del análisis de resultados analizado como un DCA.

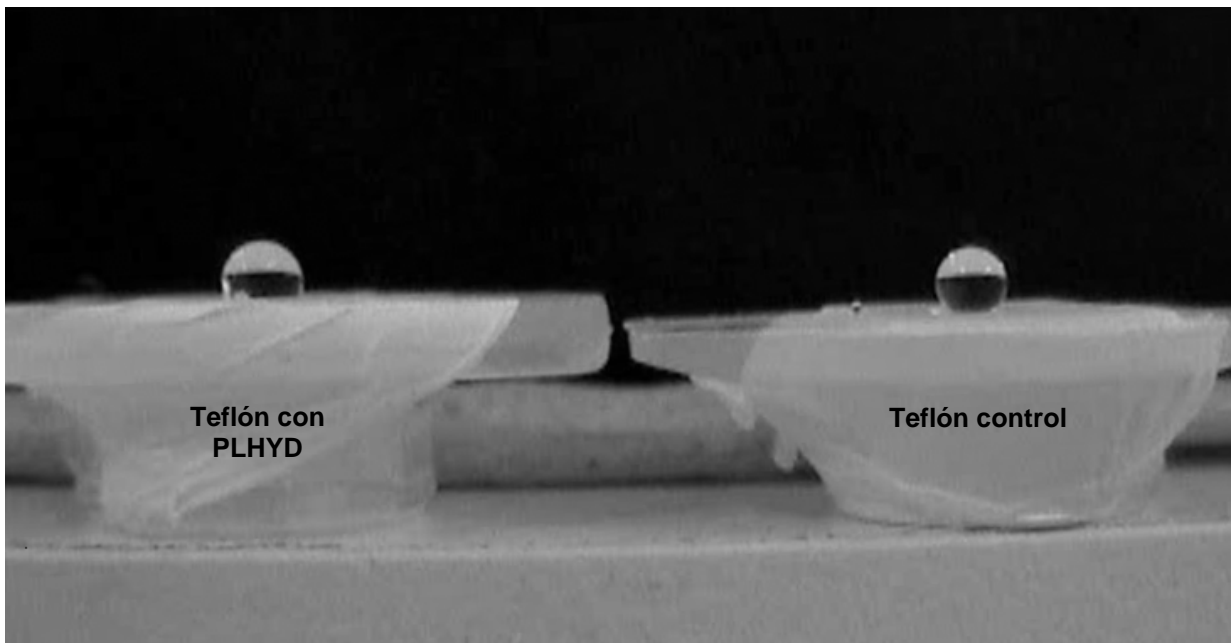
- De la tabla de ANOVA se obtiene un ProbLevel de  $0,000000 < \alpha (0.05)$ , por lo que se rechaza  $H_0$ , y se concluye que la hipótesis alternativa es verdadera. Es decir, que al menos una condición produce una respuesta diferente promedio de cuando menos una de las demás condiciones.
- Con la prueba de Kruskal-Wallis también se rechaza  $H_0$ , lo que implica que al menos dos medias son diferentes.
- Con la prueba de Duncan se encuentra que no existe diferencia significativa entre la respuesta promedio del Hexano y Parafilm.
- Sin embargo dado que las muestras no son del mismo tamaño se realiza la prueba de Tukey-Kramer, donde se obtiene que no existe diferencia significativa entre la respuesta promedio del Etanol y Glucosa. Así como que no existe diferencia significativa entre la respuesta promedio del Hexano y Parafilm.

**A8. Hidrofobicidad superficial de *R. similis* crecido con etanol, n-hexano; y controles abióticos teflón y vidrio.**

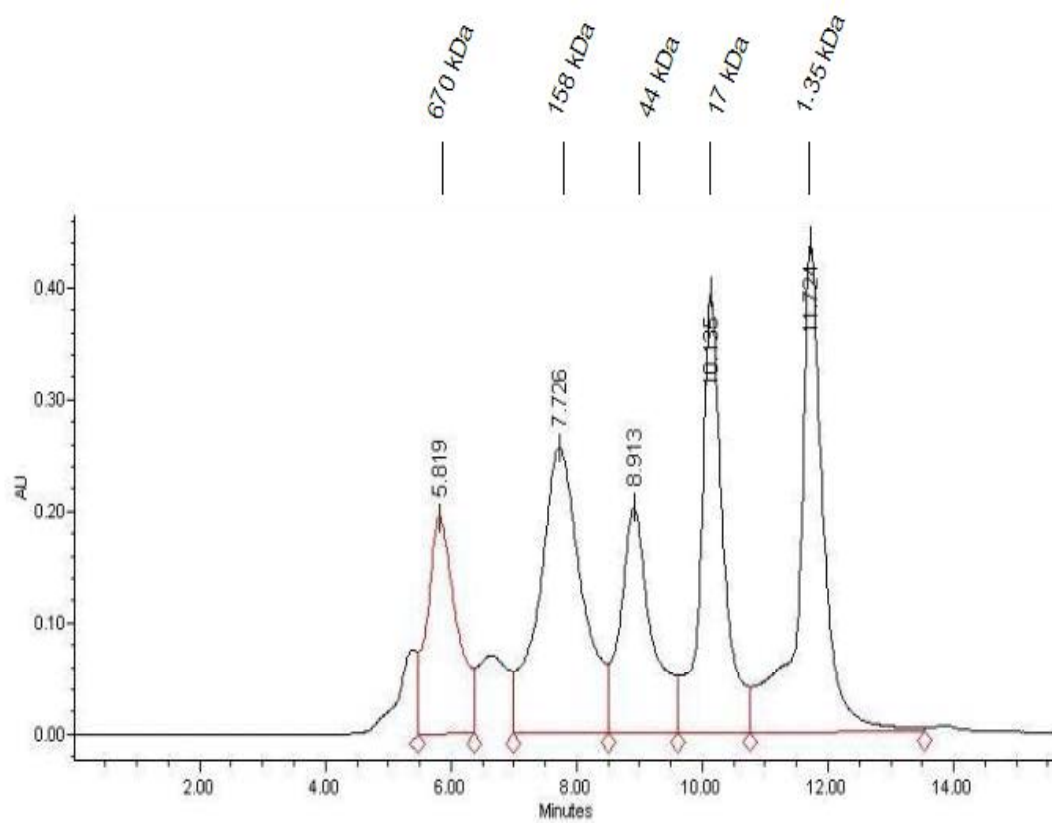


**Figura A8.** Angulo de contacto de una gota de agua sobre A, Teflón; B, Vidrio; y micelio de *R. similis* crecido con C. n-hexano; o D. etanol.

**A9. Actividad superficial de la hidrofobina PLHYD de *P. lilacinus* evaluada sobre una superficie hidrofóbica de teflón.**

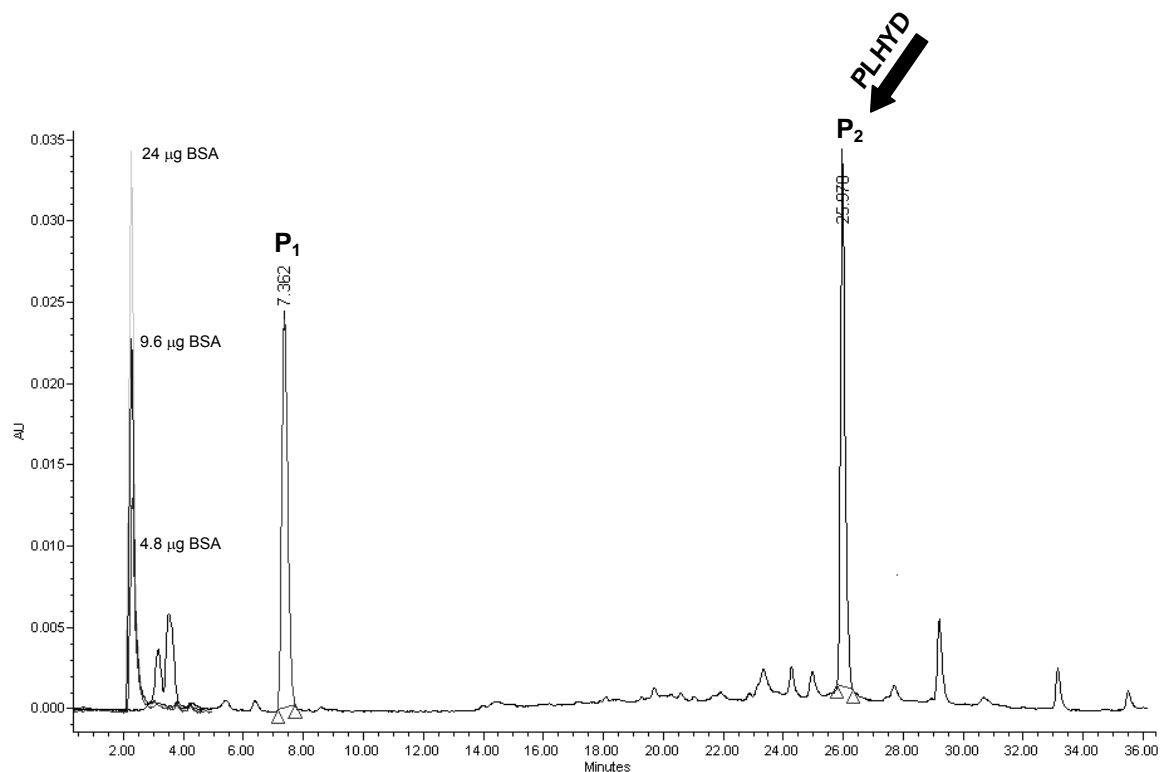


**Figura A9.** Gota de agua colocada sobre una superficie de teflón con la hidrofobina PLHYD (izquierda) y el control sin proteína (derecha).

**A10. Cromatograma del estándar de peso molecular por HPLC-SEC.**

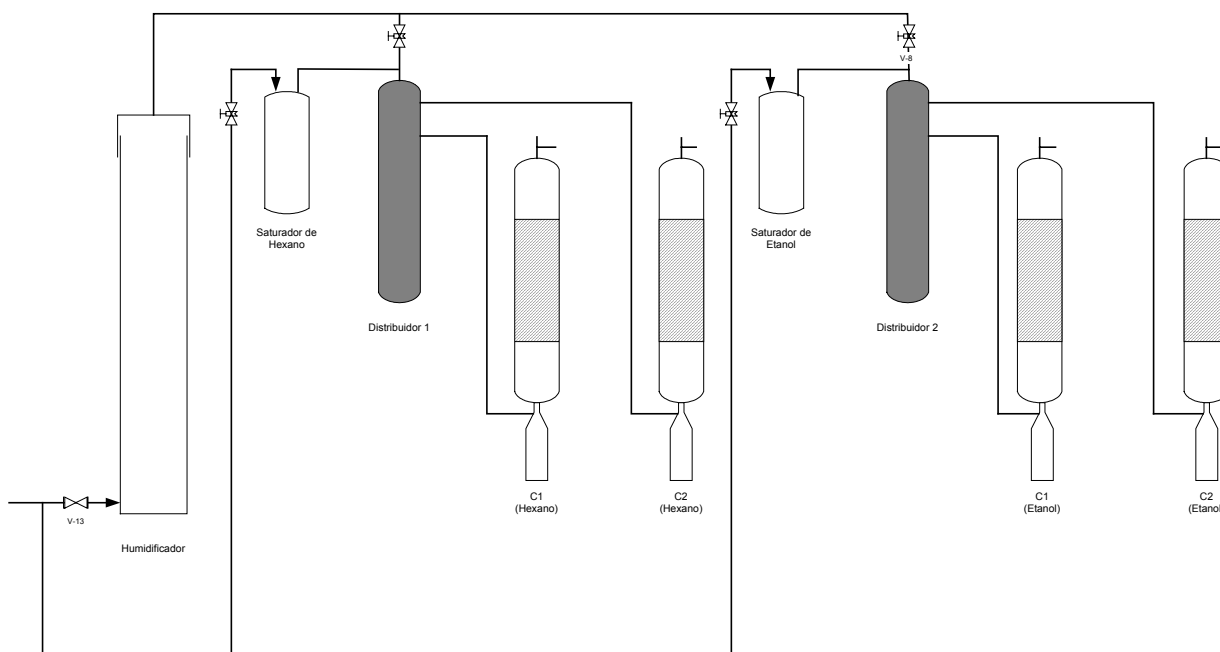
**Figura A10.** Estándar de peso molecular separado por HPLC-SEC, encima de cada pico se indica el tiempo de retención y la masa de cada proteína.

**A11. Cromatograma de la hidrofobina PLHYD extraídas del micelio producido en FMS con n-hexadecano, separada por gradiente en HPLC-RP.**



**Figura A11.** Hidrofobina PLHYD extraída del micelio producido en FMS con n-hexadecano, y separada por gradiente en HPLC-RP. También se muestran tres niveles de concentración del estándar de BSA.

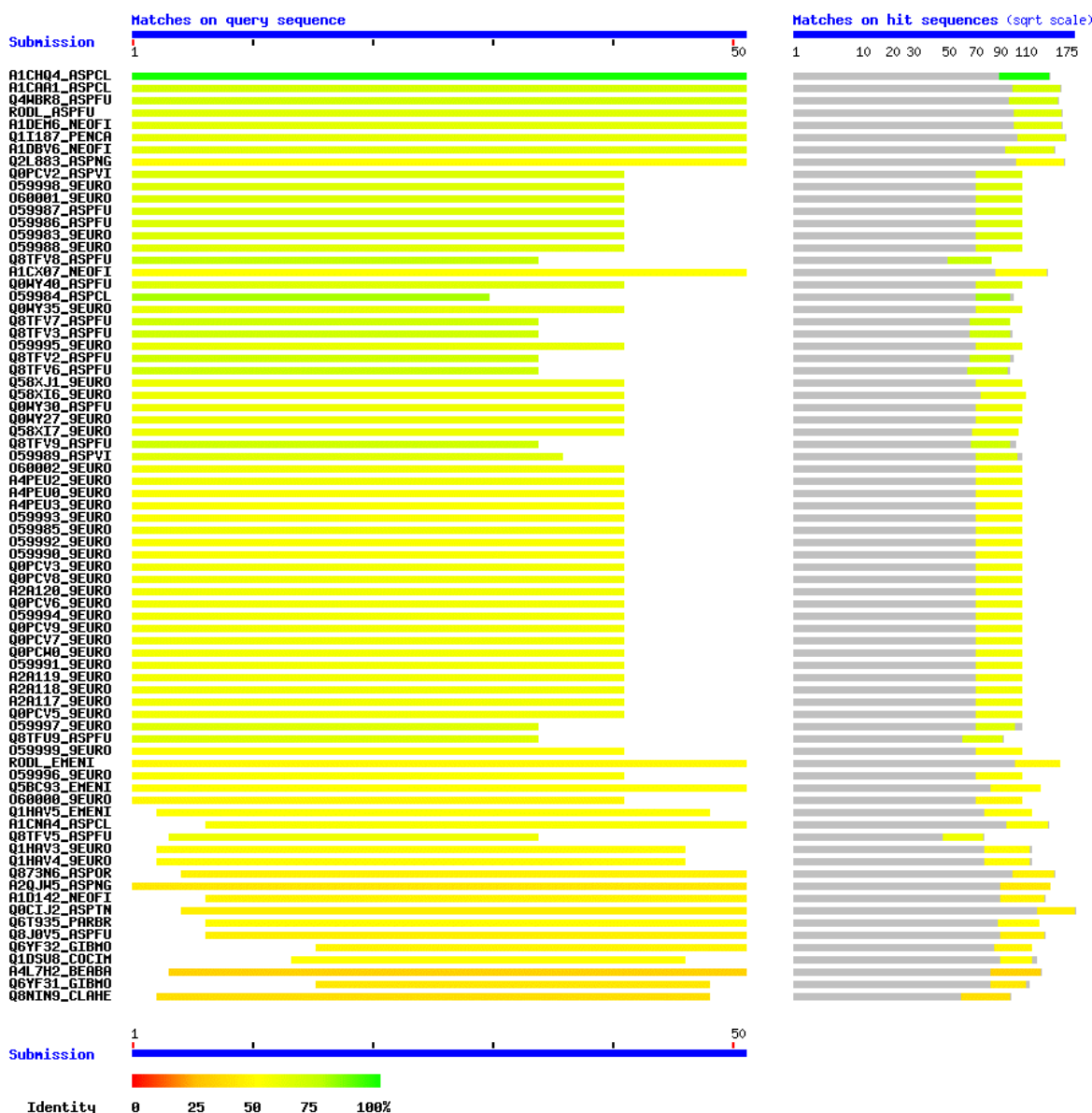
**A12. Esquema del sistema experimental, utilizado para la biofiltración de etanol o n-hexano por *R. similis*.**



**Figura A12.** Biofiltros escala laboratorio inoculados con *R. similis* alimentados con vapores de etanol o n-hexano.

### A13. Información obtenida del análisis de huella peptídica por MALDI-TOF de la hidrofobina PLHYD de *P. lilacinus*

Peptide Mass	Protein aminoacid Position	Miss Cleavages	Modifications	Peptide Modified Mass (Theoretical)	Peptide Observed Mass	Peptide sequence
5356.7887	94-145	3	Cys_CAM: 113, 119, 120, 138	5584.8745	5583.5043	LDLQIPIIGVPIQDALNQR CKQNVACCQAPKADASN DGVALSLPCIALGSVI
1061.4866	115-124	0	No modifications	1061.4866	1060.0418	QNVACCQAPK



ACLA\_048810 fungal hydrophobin, putative [ *Aspergillus clavatus* NRRL1 ]

145 a.a., 14.6 kDa Secuencia de aminoácidos:

MKFA~~LS~~IAGLVLA~~V~~SVAARPGSSPQFPILPSGMTVQQA~~AE~~KCGDQAQLSCCNQASMGGDSTNIDQGI~~AAGLLK~~DV~~L~~GGGS  
VNQGVNLFQCAKLDLQIPIIGVPIQDALNQRCKQNVACCQAPKADASN~~DGVALSLPCIA~~ LGSVI

Patrón consenso hidrofobinas clase I

X<sub>26-85</sub>-C-X<sub>5-8</sub>-C-C-X<sub>17-39</sub>-C-X<sub>8-23</sub>-C-X<sub>5-6</sub>-C-C-X<sub>6-18</sub>-C-X<sub>2-13</sub>,



**A14. Artículos publicados**

**Vigueras G, Shirai K, Martins D, Franco T, Fleuri L. Revah S (2008)** Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:147-154

**Vigueras G, Arriaga S, Shirai K, Morales M and Revah S (2009)** Hydrophobic response of the fungus *Rhinoctadiella similis* in the biofiltration with volatile organic compounds with different polarity. *Biotechnol Lett.* **31**:1203–1209.

**A15. Trabajos presentados en congresos**

**Vigueras G, Shirai K, Revah S (2007)** Determinación de Actividades Quitinolíticas, Respiratorias y de Crecimiento en Hexadecano de *L. lecanii* y *P. lilacinus*. IV Simposio Iberoamericano de Quitina. Natal, Brasil (Póster).

**Vigueras G, Dambo L, Revah S (2009)** Evaluación de soportes hidrofóbicos para la biodegradación de tolueno en biofiltros de fase gas con *Paecilomyces variotii*. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco Guerrero, México (Póster).

**Vigueras G, Shirai K, Morales M, Revah S (2009)** Crecimiento de *Paecilomyces lilacinus* con n-hexadecano y determinación de su hidrofobina PLHYD. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco Guerrero, México (Póster).

**Vigueras G, Shirai K, Morales M, Revah S (2009)** Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* for biomass production and recovery of a hydrophobin protein. 3rd International Congress Biotechniques for Air Pollution Control. Delft, The Netherlands In: Proc 112-117 (Presentación oral).



# Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof

Gabriel Viguera · Keiko Shirai · Daniel Martins ·  
Telma Teixeira Franco · Luciana Francisco Fleuri ·  
Sergio Revah

Received: 27 February 2008 / Revised: 31 March 2008 / Accepted: 1 April 2008 / Published online: 29 April 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** *Paecilomyces lilacinus* consumed toluene as the sole carbon source in a gas-phase biofilter packed with perlite obtaining an average elimination capacity of  $50 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , a removal efficiency of 53%, and a final biomass of  $31.6 \text{ mg biomass g dry support}^{-1}$ . Hydrophobin proteins from the mycelium produced in the biofilter were purified by formic acid extraction and precipitated by electrobubbling, and the molecular weight was found to be  $10.6 \pm 0.3 \text{ kDa}$ . The peptide mass fingerprinting analysis of the purified hydrophobin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight resulted in the identification of two peptides that presented high homology with sequences of class I hydrophobin proteins from other

ascomycetous fungi when compared against the National Center for Biotechnology Information database. The yield of hydrophobin (PLHYD) from *P. lilacinus* was  $1.1 \text{ mg PLHYD g biomass}^{-1}$ . These proteins modified the hydrophobicity of Teflon by lowering the contact angle from  $130.1 (\pm 2)^\circ$  to  $57.0 (\pm 5)^\circ$  supporting hot sodium dodecyl sulfate washing. This work is the first report about biodegradation of toluene by the nematophagous fungus *P. lilacinus* in a gas-phase biofilter and the identification of its hydrophobin protein.

**Keywords** Fungal biofilter · *Paecilomyces lilacinus* · Hydrophobicity · Hydrophobins

G. Viguera · K. Shirai  
Departamento de Biotecnología,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,  
Av. San Rafael Atlixco no. 186,  
09340 México, DF, México

S. Revah (✉)  
Departamento de Procesos y Tecnología,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa,  
c/o IPH, UAM-Iztapalapa,  
Av. San Rafael Atlixco no. 186,  
09340 México, DF, México  
e-mail: srevah@xanum.uam.mx

D. Martins  
Laboratório de Proteômica,  
Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia,  
Universidade Estadual de Campinas,  
Campinas, SP, Brazil

T. T. Franco · L. F. Fleuri  
Faculdade de Engenharia Química,  
Universidade Estadual de Campinas,  
Campinas, SP, Brazil

## Introduction

Biofiltration is a biological process used to treat contaminated air that takes advantage of the ability of microorganisms to transform organic and inorganic pollutants into less toxic compounds (Revah and Morgan-Sagastume 2005). The proliferation of fungi in biofilters is frequent due to their ability to tolerate acid and low humidity conditions, and consequently the number of fungal strains isolated from these systems has increased (Prenafeta-Boldu et al. 2001; Kennes and Veiga 2004). Fungal biofilters have shown greater elimination capacities (ECs) for some hydrophobic compounds as compared to their bacterial counterparts. García-Peña et al. (2001) found an EC for toluene of around  $250 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  using *Paecilomyces variotii*, which is about five times higher than the reported values usually found in bacterial biofilters. Hexane EC between 100 to  $150 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  have been reported with *Aspergillus niger* (Spigno et al. 2003) and greater than

$90 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  with *Fusarium solani*, whereas the reported performance with bacterial consortia ranged between 10 and  $60 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (Arriaga and Revah 2005a, b). van Groenestijn and Liu (2002) suggests that the fungal physiology related to surface phenomena, such as aerial mycelium formation and surface hydrophobicity, increased the transport of these compounds. Vergara-Fernández et al. (2006) reported the diminution of the partition coefficient of gaseous hexane and the increase in the surface hydrophobicity of the mycelia of *Fusarium solani* when grown in solid media with hexane as compared to the growth with less hydrophobic compounds in liquid cultivation. On the other hand, fungi grow slower and may induce clogging and channel formation when there is overgrowth, and its spore forming ability may produce health hazards if the reactor is not properly operated (Prenafeta-Boldu et al. 2001; Aizpuru et al. 2005; Arriaga and Revah 2005b).

The surface hydrophobicity of fungi is closely related with the occurrence of hydrophobins (Muñoz et al. 1997), small amphipathic proteins (~100 amino acids) with surface activity, which are exclusively produced by filamentous fungi (ascomycetes and basidiomycetes). Hydrophobins conserve a distribution of eight cysteine residues and the capacity to self-assemble at hydrophilic–hydrophobic interfaces and participate in the aerial growth, in the formation of air channels for gas exchange, and in the adhesion to hydrophobic surfaces and increase the resistance to desiccation (Wessels 1997; Wösten 2001; Scholtmeijer et al. 2001; Linder et al. 2005).

Besides using fungi in biofilters for the removal of air pollutants, it has been proposed that the cultivation method can be adapted to obtain added value products from the formed biomass such as the excretion of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 in a biofilter packed with sugarcane bagasse and fed with gaseous ethanol as inducer (Meza et al. 2005).

Filamentous fungi used in biological control are able to grow utilizing hydrophobic compounds. Napolitano and Juárez (1997) reported that entomopathogenic fungi are able to transform hydrocarbons similarly to those of their insect hosts into different lipid products, which may be subsequently used for energy production and biosynthesis of cellular components. Crespo et al. (2002) showed that the virulence of *Beauveria bassiana* increased when cultivated in media supplemented with hydrocarbons. *Paecilomyces lilacinus*, widely used against phytopathogenic nematodes, is able to metabolize the aromatic hydrocarbons biphenyl and dibenzofuran (Gesell et al. 2001, 2004). The hydrophobicity surface of fungi facilitates adhesion to the host cuticle by nonspecific hydrophobic interactions between the fungal cell wall and the waxy cuticle (Hegedus et al. 1992; Doss et al. 1993; Sosa-Gomez et al. 1997).

Herein, this is an original study where a fungus with a potential application as a biological control agent was grown on a gaseous hydrophobic substrate and its hydrophobin production was investigated. The presence and identification of hydrophobins have been reported in liquid culture in other fungi, but the class I hydrophobins, related with aerial mycelia, in *P. lilacinus* in solid-gas systems have never been described, at least to the best of our knowledge.

## Materials and methods

### Fungal strains

*P. lilacinus* CBS 284.36, an ascomycete, is described as a phytopathogenic nematodes parasite used in biological control. The strain was propagated on potato dextrose agar at 28°C and maintained at 4°C.

### Mineral medium

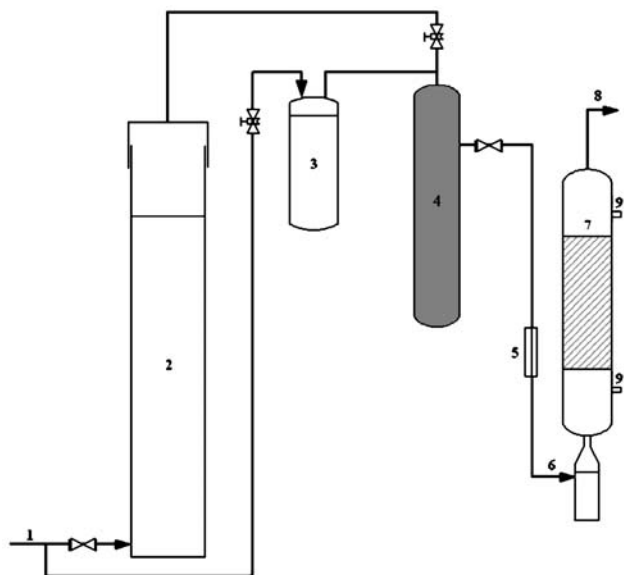
The mineral medium contains: ( $\text{g L}^{-1}$ )  $\text{NaNO}_3$  6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.38,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25,  $\text{CaCl}_2$  0.055, and 4  $\text{mL L}^{-1}$  of solution of trace elements containing  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.015,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.012,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.013,  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0023, and  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.0015. The pH of medium was 5.3.

### Microcosm experiment

The consumption of toluene was evaluated in a 125-mL flask inoculated with  $2 \times 10^7$  spores per milliliter. The flasks were sealed with inert Teflon valves (VICI Precision Sampling) and liquid toluene of 5  $\mu\text{L}$  was added with a microsyringe to obtain a concentration in the headspace of  $35 \text{ g m}^{-3}$ . Control samples were prepared without toluene. All the samples were incubated at 28°C and 180 rpm. Toluene and  $\text{CO}_2$  concentrations were monitored by gas chromatography (GC) from headspace samples. The experiments were performed by duplicate. The biomass was determined by measuring the total protein (Bradford 1976). The integrated Gompertz model was used to obtain the maximum consumption rate of toluene in the microcosms as reported by Acuña et al. (1999). The parameters of the model were calculated using Origin (Origin-Lab Corporation version 7.0).

### Laboratory-scale biofilters

Figure 1 represents the laboratory-scale biofiltration system used for the biodegradation of gaseous toluene by *P. lilacinus*. All the experiments were carried out at 28°C using a 0.230-L glass biofilter packed with perlite and



**Fig. 1** Schematic of the experimental setup, 1 air, 2 humidifier, 3 toluene evaporator, 4 mixing chamber, 5 flow meter, 6 air inlet, 7 biofilter, 8 air outlet, 9 sampling ports

impregnated with mineral medium containing  $2 \times 10^7$  spores per milliliter. A stream of toluene vapors was mixed with moistened air and then passed through the biofilter with a flow rate of  $100 \text{ mL min}^{-1}$ , and the empty bed residence time was 1.7 min. The toluene inlet concentration was  $5 \text{ g m}^{-3}$  ( $\pm 1 \text{ g m}^{-3}$ ). After day 10, the mineral medium with bacterial antibiotics ( $0.05 \text{ mg mL}^{-1}$  gentamicin sulfate and  $0.02 \text{ mg mL}^{-1}$  chloramphenicol) was added to the reactor every 48 h. Toluene and  $\text{CO}_2$  concentrations in the inlet and outlet stream of the biofilter were monitored at 24-h intervals. The biomass was determined measuring the total protein as reported by García-Peña et al. (2001). One gram of the support was mixed with 5 mL of phosphoric acid (0.5 M) and then heated in a water boiling bath for 7 min before centrifuging at  $1,380 \times g$  for 15 min. The protein in the solution was determined by Bradford (1976). The biomass of *P. lilacinus* grown in the liquid culture was used as the control.

#### Gas chromatography analysis

Toluene concentration was determined by injecting  $100 \mu\text{l}$  of sample with a precision syringe (VICI Precision Sampling) into a GC (Agilent Technologies) equipped with a flame ionization detector and a column AT-WAX. Temperature conditions were the following: injector  $200^\circ\text{C}$ , oven  $65^\circ\text{C}$ , and detector  $250^\circ\text{C}$ , and the flow rate of the carrier gas (helium) was  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ .  $\text{CO}_2$  concentration was determined by a thermal conductivity detector with a Poropack column. The operating conditions were injector  $110^\circ\text{C}$ , oven  $65^\circ\text{C}$ , detector  $110^\circ\text{C}$ , and flow rate of  $4.4 \text{ mL min}^{-1}$ . Measurements were carried out by duplicate.

#### Extraction and purification of the hydrophobins

The hydrophobins were extracted from the mycelium previously produced in the biofilter, according to a modified version of the procedure described by Ying and Feng (2004). A sodium dodecyl sulfate (SDS; 2% in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0) extraction was performed during 2 h at room temperature followed by centrifugation at  $7,500 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. The pellet was suspended in concentrated formic acid (FA) and sonicated three times during 30 s in cold water. The soluble proteins in FA were separated by centrifugation at  $7,500 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. The supernatant was neutralized with a 45% NaOH solution (w/v) to pH 7.0 and kept overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The neutralized solution was centrifuged at  $1,500 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 10 min, and the pellet was resuspended in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The hydrophobins were precipitated by electrobubbling in a glass column with a Pt filament at the bottom; 300 mA were applied during 1 h, and the foam was collected for freeze drying (Lugones et al. 1998). Hydrophobin proteins were purified by ultrafiltration with a Centricon-10 concentrator (Amicon). The Bradford method was used to determine total protein content.

#### Analysis by size-exclusion high-performance liquid chromatography

Size-exclusion high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC) with a gel filtration column of  $5 \mu\text{m}$  Bio-Silect 250 SEC ( $30 \text{ cm} \times 7.8 \text{ mm}$  inner diameter [ID]; Bio-Rad) was used. The injected volume was  $20 \mu\text{l}$ , and the mobile phase was  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.05 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M, and NaCl 0.15 M, pH 6.8. The flow rate was  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ , and detection was performed at 280 nm. The molecular weight standard (Bio-Rad) was used to calibrate the system.

#### Protein analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Protein profiles were analyzed on the basis of molecular mass by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the technique of Laemmli (1970). The gels were stained with Coomassie blue R-250 or silver stain. Protein bands were analyzed with an image-processing software (PQQuest Basic 8.0.1, Bio-Rad), using broad-range standard proteins (Invitrogen).

#### Analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography

Protein samples were analyzed by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) according to Tagu et al. (2000) by using a  $5\text{-}\mu\text{m}$  Supelcosil LC 304 column ( $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$  ID) protected by a  $5\text{-}\mu\text{m}$

Supelguard LC 304 guard column (2 cm×4.6 mm ID; Supelco). The volume injected was 20  $\mu\text{l}$ , and the mobile phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and 50% (v/v) acetonitrile with a pH of 3.0. The flow rate was 0.8 mL  $\text{min}^{-1}$ , and detection was performed at 280 nm.

Identification of hydrophobin by peptide mass fingerprint using MALDI-TOF

Hydrophobin peptides were extracted from the SDS gel and followed by an in-gel trypsin digestion, according to Schevchenko et al. (1996) using sequencing-grade modified porcine trypsin (Promega-adison). Peptides were purified using C18 ZipTips (Millipore) and eluted directly with a matrix solution of 2% w/v  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma), 60% acetonitrile, and 0.1% v/v TFA in the sample plate. Peptides were analyzed on a Voyager DE-PRO matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) as the spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Internal mass calibration was performed using trypsin autodigestion products (842.509, 1,045.563, and 2,211.104 Da). The masses of monoisotopic peaks were searched against the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the web-based software MS-Fit from University of California, San Francisco (<http://169.230.19.26:8080/prospector/4.27.1/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>).

Surface activity on hydrophobic solid

The surface activity of the hydrophobin-containing solution was evaluated on a 0.25-cm<sup>2</sup> hydrophobic surface of polytetrafluoroethylene (or Teflon). The hydrophobic surface was previously washed three times with ethanol, rinsed three times with water, and air-dried for 12 h. Then 200  $\mu\text{l}$  of hydrophobin-containing solution (52.5  $\mu\text{g}$  protein  $\text{mL}^{-1}$ ) was placed in the Teflon surface and dried for 16 h. A 2% SDS at 90°C washing was done for 1 min and rinsed three times with water before air drying for 16 h, according to Wösten et al. (1994). Control samples were identically prepared without the hydrophobin-containing solution. The surface hydrophobicity was determined by measuring the contact angle of a water drop (1  $\mu\text{l}$ ) with a goniometer (CAM-Micro 600, Tanteq). Analyses were performed by sixuplicate, in three different points of each surface.

## Results

### Microcosm experiments

Biomass growth in the microcosm added with toluene started on day 4; an abundant biomass formation was

observed, when compared to the control experiments (without carbon source), which did not show any significant growth even after 20 days of exposure. Experimental data of toluene consumption fitted with the Gompertz model yields an estimated  $V_{\text{max}}$  of 5.15 mg toluene  $\text{g}$  biomass<sup>-1</sup>  $\text{h}^{-1}$ , with a total consumption of 53% and 44.3% mineralization of the consumed toluene to  $\text{CO}_2$  corresponding to 1.44 mg  $\text{CO}_2$  mg toluene<sup>-1</sup>.

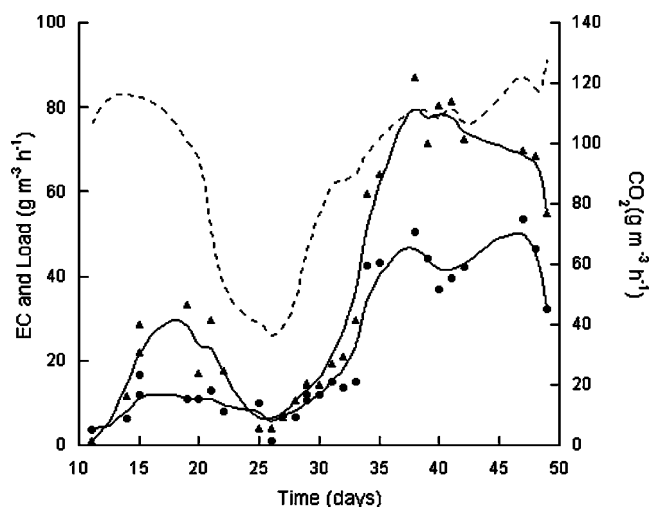
### Biofiltration experiments

Since day 8, the fungal growth was visible over the solid support, and some pellets were formed in the leachate. The average inlet load of toluene at the entrance of the column was 91  $\text{g}$   $\text{m}^{-3}$   $\text{h}^{-1}$  with fluctuations in the air flow (80±10 mL  $\text{min}^{-1}$ ). The evolution of toluene consumption in the biofilter is shown in Fig. 2. The EC and  $\text{CO}_2$  production increased from day 10, reaching values of 50 and 120  $\text{g}$   $\text{m}^{-3}$   $\text{h}^{-1}$ , respectively. The decrease in EC and  $\text{CO}_2$  production between days 22 and 28 was due to a low inlet load to the reactor. The maximum removal efficiency (RE) of 53% was reached on day 34. The final biomass was 31.6 mg biomass  $\text{g}$  dry support<sup>-1</sup>.

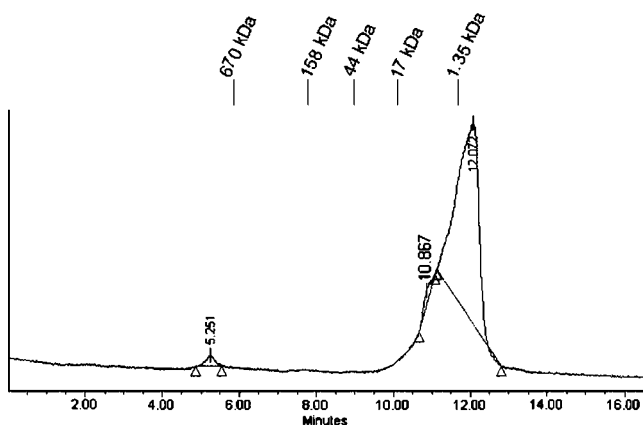
### Purification and identification of hydrophobins

Figure 3 shows the SEC-HPLC chromatogram of the material precipitated by electrobubbling after extraction from the mycelium obtained in the biofilter. The largest peak detected corresponds to peptides smaller than 1.35 kDa, followed by proteins of low molecular weight, around 17 to 1.35 kDa.

SDS-PAGE and RP-HPLC (Fig. 4) showed a dense band assigned to a low-molecular-weight protein (10.3 kDa),



**Fig. 2** Time course of toluene load (dashed line), toluene EC (circles) and  $\text{CO}_2$  production (triangles) in the biofilter inoculated with *P. lilacinus*

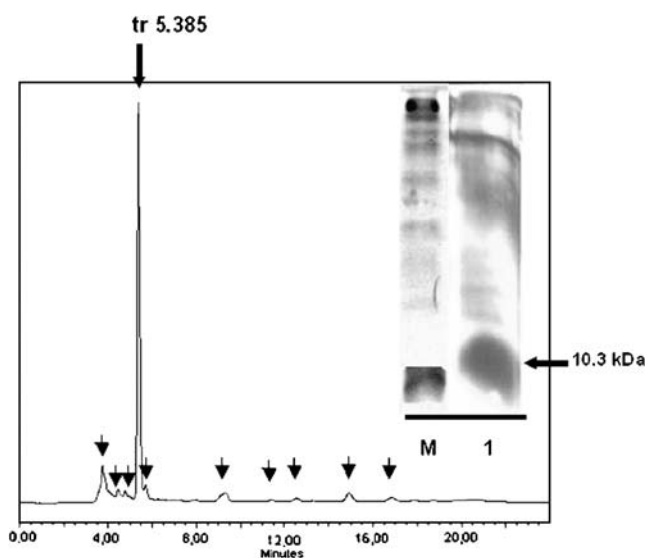


**Fig. 3** SEC-HPLC of proteins precipitated by electrobubbling and extracted from the mycelium of *P. lilacinus* obtained in the biofilter with toluene vapors. The retention time of the molecular weight standards are indicated at the top

which was determined in a gel at 17% with silver staining. The chromatogram shows ten peaks; the most intense (70% of area) was detected at 5.3 min in an isocratic system of acetonitrile–water 50:50.

Figure 5 shows the analysis of the purified hydrophobin. The apparent molecular weight was 11 kDa as determined by SDS gel at 15% stained with Coomassie blue. The chromatogram of RP-HPLC shows only three peaks; the most intense (60% of area) was detected at 5.3 min, which probably corresponds to the hydrophobin protein. The other two peaks were not identified. The final hydrophobin yield calculated in relation to biomass ( $Y_{\text{PLHYD}/X}$ ) was 1.1 mg PLHYD g biomass<sup>-1</sup>.

Figure 6 shows the hydrophobin peptide mass fingerprint obtained by MALDI-TOF of the protein of 11 kDa



**Fig. 4** RP-HPLC and SDS-PAGE (gel 17% stained with silver). Line M, molecular weight standard. Line 1, hydrophobin precipitated by electrobubbling extracted from the mycelium of *P. lilacinus* produced in the biofilter with toluene vapors

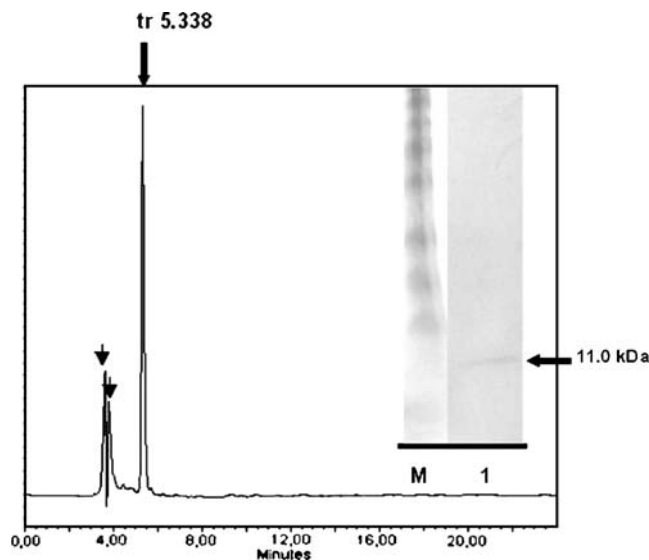
separated by SDS-PAGE. Hydrophobin peptide masses, resulting from tryptic digestion, were searched in the NCBI database. Therein, two peptide sequences were identified; the most intense peak corresponds to a peptide of ten amino acids (1,060.0418 Da) and the other one to a peptide of 52 amino acids (5,583.5043 Da). Both showed a 100% homology with a portion of hydrophobin sequence from the ascomycete *Aspergillus clavatus*.

The surface activity assay of the hydrophobin PLHYD showed its capability to modify the hydrophobicity of Teflon by decreasing the contact angle from 130.1 ( $\pm 2$ )° to 57.0 ( $\pm 5$ )° even after several washes with hot 2% SDS.

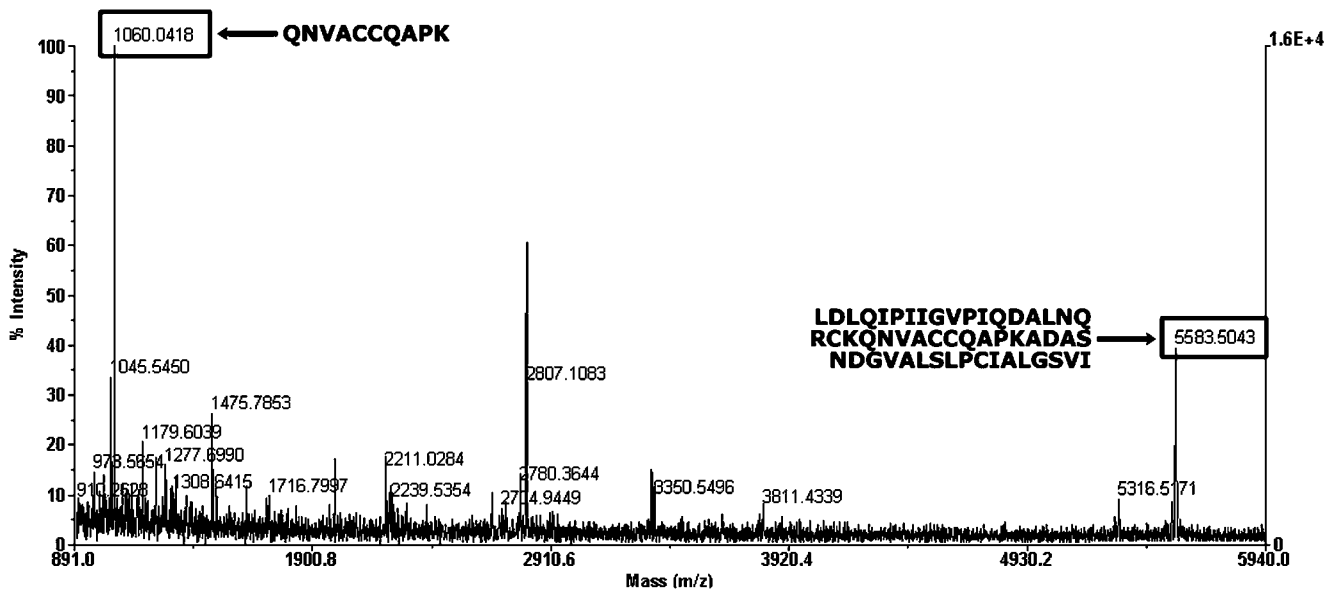
## Discussion

The experiments in microcosms showed that the nematophagous *P. lilacinus* was able to grow using toluene as the sole carbon and energy sources. Those experiments were conducted in closed flasks, where the consumption of the substrate, CO<sub>2</sub> accumulation, and biomass formation were monitored. Earlier reports have shown that some filamentous fungi are capable to biodegrade toluene in the gas phase (Prenafeta-Boldu et al. 2001; García-Peña et al. 2001; Spigno et al. 2003; Kennes and Veiga 2004; Arriaga and Revah 2005a, b).

As this is the first report on the degradation of toluene by *P. lilacinus*, it was decided to continue the studies on a gas-phase biofilter, a similar system to solid-state fermentation but using gaseous toluene as the substrate. Maximum ECs of around 50 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (RE 53%) with *P. lilacinus* were obtained. These values were similar to the volumetric EC of



**Fig. 5** RP-HPLC and SDS-PAGE (gel 15% stained with Coomassie blue). Line M, molecular weight standard. Line 1, PLHYD hydrophobin purified from the mycelium of *P. lilacinus* growth in the biofilter with toluene vapors



**Fig. 6** Peptide mass fingerprint obtained by MALDI-TOF of hydrophobin PLHYD from *P. lilacinus*. Mass and amino acid sequence are showed at the top of each peak

55 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> (RE=99%) reported for *P. variotii* CBS 113409 by Estévez et al. (2005) but lower than those obtained with *Exophiala oligosperma* (EC=77 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> and RE=99%), for *Exophiala lecanii-corni* (EC=80 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> and RE=95%; Woertz et al. 2001), and *P. variotii* CBS 115145 (EC=200 g m<sup>-3</sup> h<sup>-1</sup> and RE=98%; García-Peña et al. 2005; Aizpuru et al. 2005). On the other hand, the specific EC value of 13.5 mg toluene g biomass<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> obtained with *P. lilacinus* was similar to the value of 10 mg toluene g biomass<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> reported by Aizpuru et al. (2005) with *P. variotii*. The difference in performance can be explained partially on the increased biomass attained with *P. variotii*, which was favored by the inclusion of glucose at startup, the addition of mineral medium with higher nitrogen concentration, and by longer growth periods. Furthermore, despite being the same genus, *P. variotii* is probably better adapted to the conditions found in biofilters as it was originally isolated from a toluene-fed biofilter (Auria et al. 2000) and has been isolated elsewhere under similar conditions (Estévez et al. (2005)), while *P. lilacinus* is a collection strain.

From the mycelia produced in the biofilter, a class I hydrophobin was purified by FA extraction and precipitation by electrobubbling. Most of the protocols reported to purify class I hydrophobins are essentially based on extractions with 2% SDS (removing class II hydrophobins and impurities) and TFA or FA (solubilization of hydrophobins class I) and involve a final purification step by chromatographic methods. Electro-bubbling was the method used to precipitate and to isolate hydrophobins produced in liquid culture by Lugones et al. (1998) and Sarlin et al. (2005). SEC-HPLC was used as analytical tool in the

present work to identify proteins of molecular weight of between 1.35 and 17 kDa. SDS-PAGE of the last fraction showed subsequently a smaller protein of molecular weight between 10.3 and 11 kDa, which corresponds to the reported molecular weight of hydrophobin proteins, around 12 kDa (Wessels 1997). The observed variation in gel mobility may be due to small differences of hydrophobic regions of the hydrophobins and to the formation of intramolecular disulfide bridges between cysteines (Tagu et al. 2000).

RP-HPLC showed a peak corresponding to a hydrophobin protein. Tagu et al. (2000) reported the purification and analysis of class I hydrophobin HYDpt-1 by RP-HPLC that eluted at 43% (v/v) through a gradient of acetonitrile in a column with similar characteristics.

The peptide mass fingerprinting analysis by MALDI-TOF of the 11-kDa purified hydrophobin, searched against the NCBI database resulted in the identification of two peptides that presented high homology with sequences of hydrophobin proteins from other fungal species. The 5,583.5043-Da mass peak (Fig. 6) is identical to a peptide mass generated from in silicon tryptic digestion of 14.6-kDa hydrophobin designated ACLA-048810 isolated from the ascomycete *A. clavatus*. A similarity higher than 50% with the other 76 sequences of class I hydrophobins present in different ascomycetous fungus was also found.

Class I hydrophobins have a consensus pattern X<sub>26-85</sub>-C-X<sub>5-8</sub>-C-C-X<sub>17-39</sub>-C-X<sub>8-23</sub>-C-X<sub>5-6</sub>-C-C-X<sub>6-18</sub>-C-X<sub>2-13</sub>, and they self-assemble to form very stable aggregates that can only be dissociated with concentrated TFA and FA; these type of hydrophobins form rodlets, which are related with the hydrophobic coat surfaces of the mycelia of filamentous



fungi (Wessels 1997; Wösten 2001; Linder et al. 2005). Wösten et al. (1999) reported a yield of 60 mg L<sup>-1</sup> of the hydrophobin SC3 from *Schizophyllum commune* in an aqueous medium, and Askolin et al. (2001) with *Trichoderma reesei* reported 600 mg L<sup>-1</sup> in a similar system corresponding to 20% of the total class I hydrophobin produced; nevertheless, most of the class I hydrophobin was bound to the cell wall (4.9 mg g biomass<sup>-1</sup>). Our hydrophobin final yield of 1.1 mg PLHYD g biomass<sup>-1</sup> was almost five times lower than the reported with class I hydrophobin; however, this *T. reesei* strain was genetically modified to have increased copies of the *hfb1* gene.

The characteristic property of hydrophobins is adsorption to hydrophobic–hydrophilic interfaces, at which they form amphiphilic films (Wessels 1997; Wösten 2001; Scholtmeijer et al. 2001; Linder et al. 2005). The hydrophobicity (or wettability) of a solid surface can be estimated by measuring the contact angle of a water drop on the solid. In our study, the hydrophobin PLHYD was able to modify the hydrophobicity of Teflon lowering the contact angle from 130.1 (±2)° to 57.0 (±5)° and tolerated hot SDS washing. These results agree with the work reported by Wösten et al. (1994) where a coat of SC3 hydrophobin on Teflon decreases the contact angle from 108±2° to 62±8° after hot SDS extraction. The effective hydrophobicity reduction by the fungal hydrophobins may be important in the initial contact of *P. lilacinus* on the surface coat of the host nematodes and their subsequent infection.

This is the first study on the biodegradation of gaseous toluene using a *P. lilacinus*, a nematophagous fungus, and the preliminary characterization of its hydrophobins. Current research is oriented toward improving both biomass concentration and protein production and evaluating the virulence of *P. lilacinus* against hosts.

**Acknowledgments** The authors gratefully thank SEP-CONACYT (2004-C01-46173) for the research funding and for the Ph.D. scholarship to Gabriel Viguera and also thank the European Union through the Alfa Polylyfe project.

## References

Acuña ME, Pérez F, Auria R, Revah S (1999) Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol Bioeng* 63:175–184

Aizpuru A, Dunat B, Christen P, Auria R, García-Peña I, Revah S (2005) Fungal biofiltration of toluene on ceramic rings. *J Environ Eng* 13:396–402

Arriaga S, Revah S (2005a) Removal of n-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:548–553

Arriaga S, Revah S (2005b) Improving n-hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol Bioeng* 90:107–115

Askolin S, Nakari-Setälä T, Tenkanen M (2001) Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:124–130

Auria R, Frere G, Morales M, Acuña ME, Revah S (2000) Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnol Bioeng* 68:448–451

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–54

Crespo R, Juárez M, Dal Bello G, Padín S, Fernández G, Pedrini N (2002) Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl* 47:685–696

Doss R, Potter S, Chastagner G, Christian J (1993) Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl Environ Microbiol* 59:1786–1791

Estévez E, Veiga MC, Kennes C (2005) Biofiltration of waste gases with the fungi *Exophiala oligosperma* and *Paecilomyces variotii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:563–568

García-Peña EI, Hernandez S, Favela-Torres E, Auria R, Revah S (2001) Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol Bioeng* 76:61–69

García-Peña I, Hernández S, Auria R, Revah S (2005) Correlation between biological activity and reactor performance in the biofiltration of toluene with the fungus *Paecilomyces variotii* CBS 115145. *Appl Environ Microbiol* 71:4280–4285

Gesell M, Hammer E, Specht M, Francke W (2001) Biotransformation of biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. *Appl Environ Microbiol* 67(4):1551–1557

Gesell M, Hammer E, Mikolasch A, Schauer F (2004) Oxidation and ring cleavage of dibenzofuran by the filamentous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Arch Microbiol* 182:51–59

Hegedus D, Bidochka J, Miranpuri G, Khachatourians G (1992) A comparison of the virulence, stability and cell-wall surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36:785–789

Kennes C, Veiga M (2004) Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *J Biotechnol* 113:305–319

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685

Linder M, Szilvay G, Nakari-Setälä T, Penttilä M (2005) Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microb Rev* 29:877–896

Lugones L, Wösten H, Wessels J (1998) A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* 144:2345–2353

Meza J, Lomascolo A, Casalot L, Sigoillot J, Auria R (2005) Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: influence of ethanol vapours as inducer. *Process Biochem* 40:3365–337

Muñoz G, Nakari-Setälä T, Agosin E, Penttilä M (1997) Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* 32:225–230

Napolitano R, Juárez M (1997) Entomopathogenic fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Arch Biochem Biophys* 344:208–214

Prenafeta-Boldu F, Kuhn A, Luyckx D, Anke H, van Groenestijn W, de Bont J (2001) Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycol* 105:477–484

Revah S, Morgan-Sagastume JM (2005) Methods of odor and VOC control. In: Shareefdeen Z, Singh A (eds) *Biotechnology for odor and air pollution control*. Springer, Berlin, pp 29–63

Sarlin T, Nakari-Setälä T, Linder M, Penttilä M, Haikara A (2005) Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *J Inst Brew* 111:105–111

- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68:850–858
- Scholtmeijer K, Wessels J, Wösten H (2001) Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:1–8
- Sosa-Gomez D, Boucias D, Nation J (1997) Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J Invertebr Pathol* 69:31–39
- Spigno G, Pagella C, Fumi MD, Molteni R, De Faveri D (2003) VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chem Eng Sci* 58:739–746
- Tagu D, De Bellis R, Balestrini R, De Vries O, Piccoli G, Stocchi V, Bonfante P, Martin F (2000) Immunolocalization of hydrophobin HYDpt-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytol* 149:127–135
- van Groenestijn J, Liu J (2002) Removal of alpha-pinene from gases using biofilters containing fungi. *Atmos Environ* 35:5501–5508
- Vergara-Fernández A, Van Haaren B, Revah S (2006) Phase partition of gaseous hexane and surface hydrophobicity of *Fusarium solani* when grown in liquid and solid media with hexanol and hexane. *Biotechnol Lett* 28:2011–2017
- Wessels JG (1997) Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol* 38:1–45
- Woertz J, Kinney K, McIntosh N, Szaniszló P (2001) Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing the strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. *Biotechnol Bioeng* 75:550–558
- Wösten H (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* 55:625–646
- Wösten H, Schuren F, Wessels JG (1994) Interfacial self assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J* 13:848–854
- Wösten H, van Wetter M, Lugones L, van der Mei H, Busscher H, Wessels J (1999) How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr Biol* 9:85–88
- Ying S, Feng M (2004) Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *J Appl Microbiol* 97:323–331

# Hydrophobic response of the fungus *Rhinocladiella similis* in the biofiltration with volatile organic compounds with different polarity

Gabriel Viguera · Sonia Arriaga · Keiko Shirai · Marcia Morales · Sergio Revah

Received: 17 February 2009 / Revised: 12 March 2009 / Accepted: 17 March 2009 / Published online: 3 April 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** *Rhinocladiella similis* biodegraded volatile organic compounds (VOCs) of different polarity in gas-phase biofilters. Elimination capacities, (EC) of  $74 \text{ g}_{\text{hexane}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ,  $230 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ,  $85 \text{ g}_{\text{toluene}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  and  $30 \text{ g}_{\text{phenol}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  were obtained. EC values correlated with the solubility of the VOCs. *R. similis* grown with n-hexane or ethanol in biofilters packed with Perlite showed that the surface hydrophobicity was higher with n-hexane than ethanol. The hydrophobin-like proteins extracted from the mycelium produced with n-hexane (15 kDa) were different from those in the ethanol biofilter (8.5 kDa and 7 kDa).

**Keywords** Biofiltration · Fungal biofilter · Hydrocarbons · Hydrophobins · *Rhinocladiella similis* · Surface hydrophobicity

## Introduction

Air biofiltration is an effective technology for the abatement of odors and volatile organic compounds (VOCs). Biofilters are open systems and growth of filamentous fungi is consistently found. Fungal strains from different genera, including *Paecilomyces* spp., *Exophialia* spp., *Cladosporium* spp., etc. have been isolated and tested successfully in biofilters (Prenafeta-Boldu et al. 2001; Kennes and Veiga 2004). Fungi are known for their genetic and enzymatic diversity and grow under environmentally stressed conditions such as low nutrient availability, low water activity and low pH values, where bacterial growth might be limited (Arriaga and Revah 2005b). Many of these conditions are often found in biofilters. In previous work on n-hexane removal, two fungi, later classified as *Fusarium solani* and the black yeast-like *Rhinocladiella similis*, were isolated. *F. solani* was later tested alone in biofilters resulting in high n-hexane elimination capacities, ( $\text{EC} > 150 \text{ g}_{\text{hexane}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ), (Arriaga and Revah 2005a; Vergara-Fernández et al. 2008). Fungi show high elimination capacities (EC) with hydrophobic VOCs due to their aerial hyphae formation, which improve the surface for transport, and the surface hydrophobicity which increases the

G. Viguera · K. Shirai  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, 09340 Mexico, DF, Mexico

M. Morales · S. Revah (✉)  
Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, c/o IPH, UAM-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, 09340 Mexico, DF, Mexico  
e-mail: sreva@xanum.uam.mx

S. Arriaga  
División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT, Camino a la Presa San José No. 2055, Col. Lomas 4a. Sección, San Luis Potosí, SLP, México

partition of these compounds (van Groenestijn and Liu 2002; Vergara-Fernández et al. 2006).

Aerial growth and surface hydrophobicity are closely related with the hydrophobins, these are small proteins ( $\sim 10$  kDa) with biosurfactant activity, capable to self-assembly at hydrophilic–hydrophobic interfaces and which protect the fungal aerial structures both from excessive cytoplasmic water evaporation and wetting. They are divided in two groups according to their hydrophobicity patterns: class I are more hydrophobic and only can be solubilized in strong acids such as formic or trifluoroacetic, whereas class II hydrophobins can be extracted with diluted solutions of SDS or ethanol (Wessels 1997; Wösten 2001). So far, these proteins have been found in all filamentous fungi, and some contain more than one gene coding for hydrophobins (Wösten 2001). The most studied are SC3 of *Schizophyllum commune* and HFBI and HFBI of *Trichoderma reesei* (Linder et al. 2005). Viguera et al. (2008) isolated the PLHYD hydrophobin from *Paecilomyces lilacinus* produced in a gas-phase biofilter with toluene as the sole carbon source.

The objective of this study was to investigate the degradation by *R. similis* of VOCs with different polarity in biofilters and evaluate the changes in surface hydrophobicity and the presence of hydrophobin-like proteins when grown in perlite biofilters with n-hexane or ethanol vapors.

## Materials and methods

### Fungal strain

*Rhizoglyphus nigellii* CBS 120259, originally reported as *Cladosporium* sp., was isolated from a biofilter eliminating gasoline vapors (Arriaga and Revah 2005b). This strain was propagated on potato/dextrose/agar at 28°C and maintained at 4°C.

### Biofiltration systems

All experiments were at 30°C using 0.230 l cylindrical glass tubes. For degradation experiments, the biofilters were packed with a mixture of 20.6 g Perlite and 4.1 g wheat bran (Nutrisa Mexico, DF), sterilized and impregnated with mineral medium, reported

previously by Arriaga and Revah (2005a), and containing  $2 \times 10^7$  spores  $\text{ml}^{-1}$ . A stream of phenol, toluene or n-hexane vapor was mixed with moistened air and then passed through the biofilter at  $200 \text{ ml min}^{-1}$ , corresponding to an empty bed residence time, (EBRT), of 1.1 min. Toluene and n-hexane inlet concentrations were  $3 \pm 0.5 \text{ g m}^{-3}$ . Phenol was maintained at 45°C in a water bath and the inlet concentration was  $0.5 \text{ g m}^{-3}$ . A final set of experiments to evaluate the influence of the load rate on the bioreactor performance were carried out by varying the hydrocarbon inlet gaseous concentrations between 0.2 and  $10 \text{ g m}^{-3}$  with constant EBRT.

Biofiltration experiments with n-hexane (hydrophobic) or ethanol (hydrophilic) vapors but without wheat bran were also performed to evaluate the final biomass and isolate the hydrophobins. A stream of n-hexane or ethanol vapors was mixed with moistened air and then passed through the biofilter at  $100 \text{ ml min}^{-1}$  (EBRT = 1.7 min). n-Hexane and ethanol inlet concentration, were  $5 \pm 0.5 \text{ g m}^{-3}$ , corresponding to an inlet load of  $168 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  and  $274 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , respectively. All experiments were independently tested for each hydrocarbon by duplicate. Hydrocarbon in the inlet and outlet stream of the biofilter were monitored by GC. Data obtained in the biofiltration experiments are expressed as inlet load ( $\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ), biofilter elimination capacity ( $\text{g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) and removal efficiency (%) (Arriaga and Revah 2005a).

### Surface hydrophobicity on mycelium

Surface hydrophobicity of *R. similis* grown in n-hexane or ethanol vapors was determined by measuring the contact angle of a water drop (1  $\mu\text{l}$ ) on a fungal mat with a horizontal light computer microscope Intel Qx3 (Intel Corporation) as reported by Vergara-Fernández et al. (2006). Hydrophilic membranes (MF, Millipore,  $0.45 \mu\text{m}$ , 47 mm diam) were used and all samples were incubated under static conditions at 30°C for 20 days. The contact angle was measured from digital photos with image analysis software ImageJ1.37v (National Institutes of Health, USA). The experiments were carried out by duplicate. The measurements were performed fourfold in six different points of each sample. The experimental data were analyzed by one-way ANOVA, followed by multiple mean comparison test of Tukey's Kramer with NCSS 2001 software.

## Extraction of the hydrophobin-like proteins

The extraction of the hydrophobins related proteins from mycelium, produced in the n-hexane or ethanol biofilters was based on the dissolution of the assemblages of class II hydrophobins by diluted SDS according to the procedure reported by Askolin et al. (2001). The proteins were extracted with 2% (v/v) SDS in 100 mM Tris/HCl buffer, pH 9.0, for 2 h at room temperature, followed by centrifugation at  $7,740 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. The supernatants were dialyzed, and lyophilized. The total protein was determined by the Bradford method.

## Protein analysis

Protein profiles were analyzed by SDS-PAGE using the technique of Laemmli on 4% (v/v) stacking gel and 15% (v/v) resolving gel at 150 V. The gels were stained with silver (Bio-Rad). Protein bands were acquired with Gel-Doc 100 (Bio-Rad) and analyzed with image processing software (PQQuest Basic 8.0.1, Bio-Rad), using broad range standard proteins (Bio-Rad).

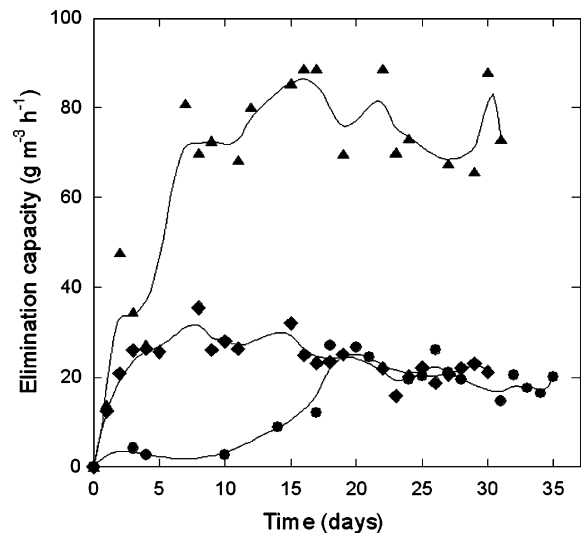
## Analytical methods

Volatile organic compounds concentrations were determined in the gas samples from the biofilters by FID-GC, according to Arriaga and Revah (2005a). The biomass was measured as volatile solids with a thermogravimetric analyzer according to Arriaga and Revah (2005b). Measurements were carried out by duplicate.

## Results and discussions

### Biofiltration of VOCs of different polarity with *Rhinochlaidiella similis*

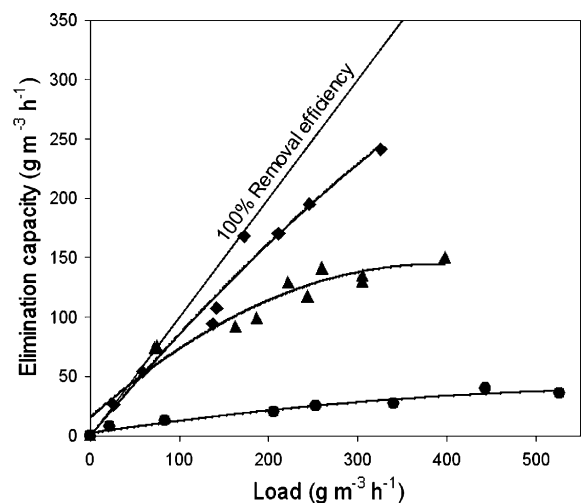
Figure 1 shows the evolution of gaseous hydrocarbons consumption in biofilters packed with a mixture of perlite and wheat bran, which allowed rapid fungal growth and hydrocarbon uptake during the first days of biofilters operation. The ECs increased gradually to reach values of  $85 \text{ g}_{\text{toluene}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (RE 50%),  $30 \text{ g}_{\text{phenol}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (RE 70%) and  $30 \text{ g}_{\text{hexane}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (RE 15%).



**Fig. 1** Time course of elimination capacity of *R. similis* in biofilters added with wheat bran fed with phenol (◆), toluene (▲) and n-hexane (●)

### Effect of hydrocarbon loads on bioreactor performance

Different loads were applied to biofilters to obtain the maximum ECs of phenol, toluene and n-hexane. Profiles are shown in Fig. 2 for the phenol biodegradation, where an EC of  $250 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (RE  $\sim 90\%$ ) for a load of  $325 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  was obtained. The EC is similar to the value of  $250 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  reported by

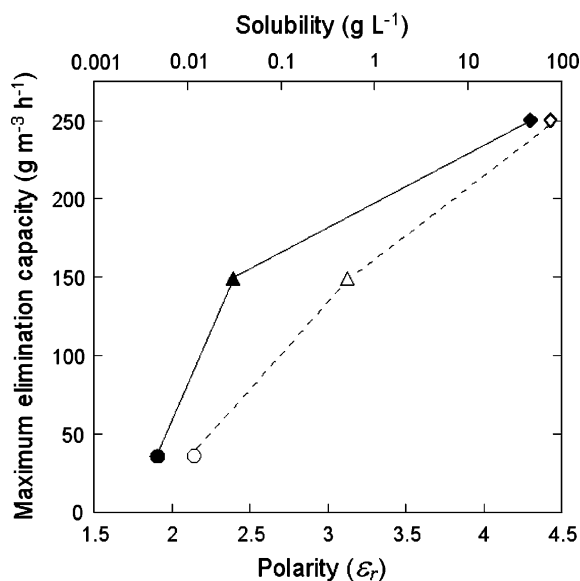


**Fig. 2** Effect of load of phenol (◆), toluene (▲) and n-hexane (●) on the elimination capacity of *R. similis*

Zilli et al. (1993) in gas phase by *Pseudomonas putida* as well as to the value of  $270 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  reported by Ryabkin et al. (2001) for the same applied load ( $\sim 300 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). In this work, it was not possible to obtain a maximum EC for phenol for the loads applied because it was difficult to attain elevated gaseous concentrations of phenol at  $45^\circ\text{C}$  for the flow applied. The maximum EC of toluene was  $150 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  for loads higher than  $350 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , this EC value is lower than that reported by Aizpuru et al. (2005) of  $245 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  with a load  $\sim 300 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  with *Paecilomyces variotii* CBS 115145.

Maximum n-hexane EC in biofilter packed with perlite-wheat bran was  $35 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  for loads greater than  $350 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . This value was lower than the value obtained by Arriaga and Revah (2005a) of  $110 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  with *F. solani* and  $150 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  reported by Spigno et al. (2003) with *Aspergillus niger* using malt extract as support (load applied  $\sim 300 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ ).

Figure 3 shows the EC obtained for each hydrocarbon at loads  $\sim 350 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  as a function of solubility and polarity of each compound. The latter is defined by the dielectric constant; polar compounds like water or ethanol have a relatively high dielectric constant (80 and 24.3, respectively) while non-polar

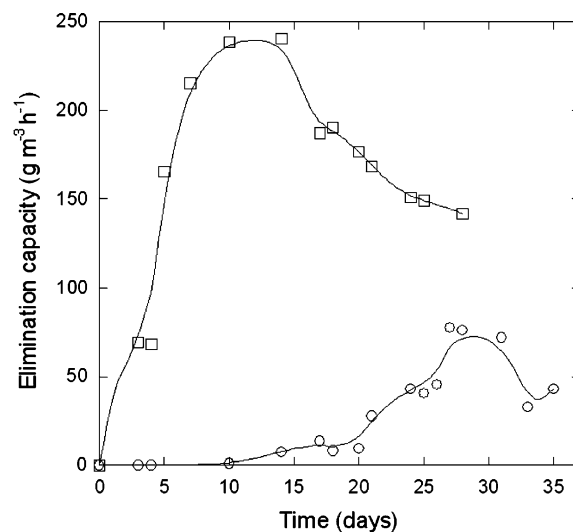


**Fig. 3** Effect of dielectric constant ( $\epsilon_r$ ), (--- open symbols) and solubility (— filled symbols) on the maximum elimination capacities of phenol ( $\blacklozenge$ ), toluene ( $\blacktriangle$ ) and n-hexane ( $\bullet$ ) from biofilters packed with perlite-wheat bran

compounds such as  $\text{O}_2$  or n-hexane (1 and 1.89, respectively) have low values. This property is related to the solubility of the compounds. The EC shows a linear correlation with polarity. The phenol EC was 40% and 75% greater than toluene and n-hexane, respectively. The biodegradation of a pollutant not only depends on its bioavailability, which is related to its solubility, but it is also important to consider the metabolic capacities of the microorganisms involved and the environmental conditions ( $A_w$ , temperature, pH, etc.). Mohseni and Allen (2000) applied biofiltration to degrade methanol and  $\alpha$ -pinene as separate substrates and in mixtures and found higher ECs for the hydrophilic compound and the suppressed growth of the  $\alpha$ -pinene degrading microbial community when the mixture was fed. The results are consistent to the data reported by Deshusses and Johnson (2000) who related the biodegradation of VOCs in biofilters to their availability.

Biofilters with VOCs of extreme polarities as sole carbon source

Figure 4 shows the evolution of gaseous hydrocarbons consumption in biofilters packed with perlite. The ethanol increased during the first days of biofilter operation, values of  $230 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (RE 74%) were reached. The specific consumption rate obtained with ethanol was  $29.3 \text{ mg}_{\text{ethanol}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . After



**Fig. 4** Time course of elimination capacities of *R. similis* in biofilters with: ethanol ( $\square$ ) and n-hexane ( $\circ$ )

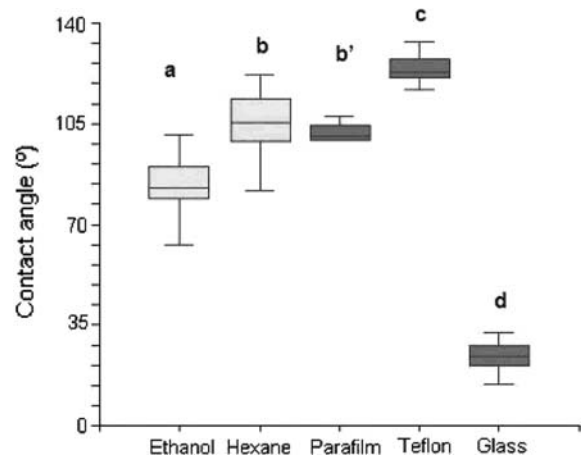
16 days, the EC decreased drastically which can be attributed to the inhibitory conditions by high concentration of ethanol in the aqueous phase, oxygen limitation or accumulation of toxic products. Christen et al. (2001) reported that steady-state in the ethanol biofiltration by *Candida utilis* was maintained for 300 h with an ethanol load of  $93.7 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ . However, at a load of  $511.9 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , no steady-state was observed due to the accumulation of toxic compounds such as acetaldehyde, acetic acid and ethyl acetate, which are produced from the partial oxidation of ethanol. The biofiltration of n-hexane showed an increased in EC after day 10, reaching  $74 \text{ g}_{\text{hexane}} \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$  (RE 70%). The specific consumption rate for n-hexane was  $17.7 \text{ mg}_{\text{hexane}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  which is close to the value of  $16.8 \text{ mg}_{\text{hexane}} \text{ g}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$  reported previously by Arriaga and Revah (2005b).

#### Surface hydrophobicity on mycelium

Surface hydrophobicity, or degree of wettability, was expressed as the water contact angle ( $\theta$ ) of a drop of water on the mycelial mat. Surface hydrophobicity of *R. similis* was higher when grown in n-hexane as compared to ethanol with contact angles of  $105^\circ$  and  $84^\circ$ , respectively. Statistical analysis shows that the mycelial mat of *R. similis* grown with n-hexane was as hydrophobic as to the abiotic control parafilm (Fig. 5). Some authors had reported that hydrophobicity variations on mycelium depend on growth medium, physiological state and water exposure. Smits et al. (2003) reported contact angles between  $107^\circ$  and  $100^\circ \pm 3$  by *Cladosporium* sp. when grown for 18 days in three different culture media. Vergara-Fernández et al. (2006) reported an increase in the surface hydrophobicity of mycelia of *F. solani* when grown in solid media with hydrophobic substrates. The contact angle on the mycelial mat was  $113^\circ$  when grown on n-hexane as compared to  $75^\circ$  with glucose and these changes were partially explained by a rise in the lipid content but it also suggest the presence of different surface molecules including hydrophobins.

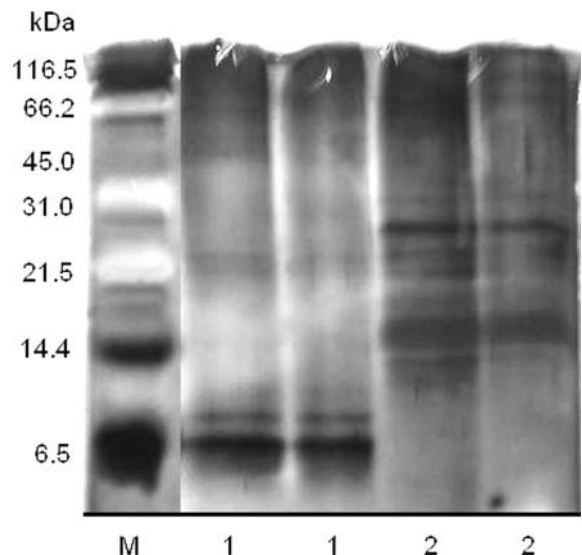
#### Profile of hydrophobin-like protein by SDS-PAGE

As hydrophobins confer hydrophobicity to fungal surfaces in contact with air (Wösten 2001), we investigated the presence of hydrophobin-like proteins



**Fig. 5** Surface hydrophobicity of the mycelium of *R. similis* obtained by growth with ethanol or n-hexane and abiotic controls (Parafilm, Teflon and Glass). Error bars represent two standard errors. Means that share letters are not significantly different (post-ANOVA, Tukey means comparisons,  $P < 0.05$ )

in the mycelia of *R. similis*. Different profiles of hydrophobin-like proteins were produced in the n-hexane and ethanol fed biofilters (Fig. 6). Proteins of 8.5 and 7 kDa were extracted from the mycelia from the ethanol biofilter which were not present



**Fig. 6** SDS-PAGE with resolving gel of 15% and stained with silver. Lanes: M, molecular weight standard; 1, proteins extracted with SDS from the mycelium produced in the biofilter with ethanol vapors; 2, proteins extracted with SDS from the mycelium produced in the biofilter with n-hexane vapors

with n-hexane grown mycelia which were around 15 kDa.

The protein profiles obtained here suggest that *R. similis* produced different hydrophobin-like proteins in response to the physicochemical properties of the substrates and may be related to the surface hydrophobicity of mycelia (Figs. 5 and 6). The low molecular weight (7 and 8.5 kDa) proteins produced with ethanol and extracted with diluted SDS are probably class II hydrophobins, which have been reported to be associated to fungal growth in aqueous media (Wösten 2001). Some reports show the presence of multiple hydrophobin genes in the same fungus, *S. commune* expressed at least four different class I hydrophobin genes. *T. reesei* presented at least three class II hydrophobins and some fungi contain genes belonging to both hydrophobin classes, like in *Cladosporium fulvum*, *Fusarium verticillioides* and *Magnaporthe grisea* (Askolin et al. 2006).

## Conclusion

This is a first report on biodegradation of ethanol, phenol, toluene and n-hexane as single substrates in a gas-phase biofilter using *R. similis*. The mixture of Perlite and wheat bran as support and additional source of carbon for fungal growth allowed and sustained the biodegradation of hydrocarbons and a rapid start-up. The performance of the reactors was dependent on hydrocarbon polarity; ethanol and phenol were more easily biodegraded than toluene and n-hexane. *R. similis* adapted by modifying its surface hydrophobicity and expression of hydrophobin-like molecules when grown with compounds of opposite polarities, such as ethanol or n-hexane. Research related to the treatment in fungal biofilters of hydrophobic gaseous pollutants has suggested that the biosurfactant activity of hydrophobins may have an important role in the solubility and transfer of VOCs, but more work is needed in this respect. Based on the results in this study, the metabolic diversity of *R. similis* could be interesting for further studies on biofiltration of VOCs mixtures.

**Acknowledgments** The authors wish to thank CONACYT (SEMARNAT-120-2001) for financing this work. In addition, we thank the technical support of Sergio Hernández and the experimental assistance of Miguel Arellano.

## References

- Aizpuru A, Dunat B, Christen P, Auria R, García-Peña I, Revah S (2005) Fungal biofiltration of toluene on ceramic rings. *J Environ Eng* 13:396–402
- Arriaga S, Revah S (2005a) Removal of n-hexane by *Fusarium solani* with a gas-phase biofilter. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:548–553
- Arriaga S, Revah S (2005b) Improving n-hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol Bioeng* 90:107–115
- Askolin S, Nakari-Setälä T, Tenkanen M (2001) Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:124–130
- Askolin S, Linder M, Scholtmeijer K, Tenkanen M, Penttilä M, de Vocht M, Wösten H (2006) Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules* 7:1295–1313
- Christen P, Domenech F, Michelena G, Auria R, Revah S (2001) Biofiltration of volatile ethanol using sugar cane bagasse inoculated with *Candida utilis*. *J Haz Mat* 89:253–265
- Deshusses M, Johnson C (2000) Development and validation of a simple protocol to rapidly determine the performance of biofilters for VOC treatment. *Environ Sci Technol* 34:461–467
- Kennes C, Veiga M (2004) Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *J Biotechnol* 113:305–319
- Linder M, Szilvay G, Nakari-Setälä T, Penttilä M (2005) Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microb Rev* 29:877–896
- Mohseni M, Allen D (2000) Biofiltration of mixtures of hydrophilic and hydrophobic volatile organic compounds. *Chem Eng Sci* 55:1545–1558
- Prenafeta-Boldu F, Kuhn A, Luykx D, Anke H, van Groenestijn W, de Bont J (2001) Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycol Res* 105:477–484
- Ryabkin M, Smirnov V, Vinarov A (2001) Removal of compounds in the phenolformaldehyde series from a gas/air stream by biofiltration. *Chem Petrol Eng* 37:246–252
- Smits T, Wick L, Harmas H, Keel C (2003) Characterization of the surface hydrophobicity of filamentous fungi. *Environ Microbiol* 5:85–91
- Spigno G, Pagella C, Fumi M, Molteni R, De Faveri D (2003) VOCs removal from waste gases: gas-phase bioreactor for the abatement of hexane by *Aspergillus niger*. *Chem Eng Sci* 58:739–746
- van Groenestijn J, Liu J (2002) Removal of alpha-pinene from gases using biofilters containing fungi. *Atmos Environ* 35:5501–5508
- Vergara-Fernández A, Van Haaren B, Revah S (2006) Phase partition of gaseous hexane and surface hydrophobicity of *Fusarium solani* when grown in liquid and solid media with hexanol and hexane. *Biotechnol Lett* 28:2011–2017
- Vergara-Fernández A, Hernández S, Revah S (2008) Phenomenological model of fungal biofilters for the abatement of hydrophobic VOCs. *Biotechnol Bioeng* 101:1182–1192



- Vigueras G, Shirai K, Martins D, Franco T, Fleuri L, Revah S (2008) Toluene gas phase biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and isolation and identification of a hydrophobin protein produced thereof. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:147–154
- Wessels J (1997) Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol* 38:1–45
- Wösten H (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Ann Rev Microbiol* 55:625–646
- Zilli M, Converti A, Lodi A, Del Borgui M, Ferraiolo G (1993) Phenol removal from waste gases with a biological filter by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng* 41:693–699

Iztapalapa, D.F. a 10 de diciembre de 2009.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis: “**Biodegradación de sustratos hidrofóbicos utilizando hongos filamentosos y recuperación de hidrofobinas**”, que presentó: **M. en B. Juan Gabriel Vigueras Ramírez.**

**Comité tutorial:**

Director: Dr. Sergio Revah Moiseev

Co-director: Dra. C. Keiko Shirai Matsumoto

Asesor: Dra. Marcia Morales Ibarría

**Jurado:**

Presidente: Dra. Marcia Morales Ibarría

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Vocal: Dra. Patricia Larralde Corona