

5.3 EL SUSTRATO DEGRADADO POR *PLEUROTUS PULMONARIUS* PARA LA DEGRADACION DEL INSECTICIDA ENDOSULFÁN

José E. Sánchez,¹ Gabriela M. Orozco,² Daniel Hernández Rodríguez,¹ María G. Nieto¹ y Facundo J. Márquez³

¹El Colegio de la Frontera Sur, Apartado postal 36, Tapachula, Chiapas, México

²Facultad de Biotecnología, UNACH. Carr. Puerto Madero km 1.5, Tapachula, Chiapas,

³Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, carretera Tijuana-Ensenada km 107, Baja California, México

RESUMEN

Con el fin de conocer la capacidad del género *Pleurotus* para degradar el insecticida endosulfán, se estudió el crecimiento en medio sólido en presencia de dicho insecticida de diez cepas de este género. Todas las cepas estudiadas tuvieron la capacidad de crecer en presencia del insecticida, pero se presentó una reducción de la velocidad de crecimiento (tasa de extensión radial) variable según las cepas entre 16.7 y 47.2%. Se seleccionó *P. pulmonarius* ECS-0190 por su capacidad para degradar el insecticida. Esta cepa es capaz de reducir en 99.8% el contenido inicial de endosulfán de un sustrato contaminado al crecer y fructificar en él. En una hora de contacto, el extracto de capóforos y el sustrato degradado disminuyeron hasta 0.96 y 0.62% la concentración inicial (6 mg/l) de endosulfán en agua.

Palabras clave: sustrato degradado de los hongos, biorremediación, tecnología fúngica, cultivo de hongos comestibles

INTRODUCCIÓN

Como parte final del proceso de producción de setas *Pleurotus* spp el sustrato remanente después de la colonización y cosecha de los hongos es desechado. Este subproducto es denominado Sustrato Degradado por *Pleurotus* (SDP), aunque también SDH, término empleado de manera general para referirse al subproducto orgánico generado por el cultivo de cualquier hongo comestible. Este material puede ser utilizado para relleno de suelos, en la preparación de compostas, como complemento en alimentación animal, entre varios otros usos. En la mayoría de los casos, sin embargo su aprovechamiento ha sido desestimado y no recibe ningún uso posterior (Batista *et al.* 2000, Rinker 2002, De León *et al.* 2004). Por esta razón, se buscan nuevas y mejores alternativas de aprovechamiento que hagan atractivo su reuso, recuperación o reciclaje. Entre estas alternativas se encuentra el aprovechamiento de la carga enzimática remanente del SDP para procesos de biorremediación (Martirani *et al.* 1996). Dicha alternativa resulta interesante, ya que podría contribuir a la restauración de suelos y efluentes contaminados con productos recalcitrantes, además es muy prometedora cuando se habla de setas, ya que el género *Pleurotus* representa un grupo de hongos comestibles que tiene la capacidad de degradar lignina. La actividad metabólica de las cepas que pertenecen a este género ha sido probada con resultados prometedores por la producción de enzimas y en la degradación de compuestos recalcitrantes (Bezalel *et al.* 1996, 1997; Guillén-Navarro *et al.* 1998).

En México se utilizan 3.5 millones de toneladas de plaguicidas (INSP 2005), y el endosulfán es uno de los más utilizados, ya que ha sustituido a todos los organoclorados cuya venta está prohibida en el país por sus efectos adversos en la salud y el ambiente. Las ventas de este insecticida se comparan con las de paratión metílico, el cual mantiene el liderazgo de ganancias en muchos países del tercer mundo (La Jornada 2000). Solo en la costa del Golfo de México se aplicaron 41,755 kg de ingrediente activo de endosulfán, durante 1989-1990 (Benítez y Bárcenas 1996). El empleo de este insecticida organoclorado se encuentra autorizado en México para el control de la broca del café, también se usa contra algunas plagas de otros cultivos de importancia económica. El endosulfán contamina subproductos agrícolas (Benítez y Bárcenas 1996, Dhar *et al.* 2004) y el ambiente (Gunther y Jeppson 1975, Matsumura 1980, Kullman y Matsumura

1996). Se ha demostrado que este insecticida es degradado cuando *Pleurotus ostreatus* crece en un medio líquido que lo contiene (Escobar *et al.* 2002), y que existen varias cepas que son capaces de crecer tanto en medio líquido como en medio sólido con el insecticida presente. En contacto con un sustrato que contiene endosulfán, *P. pulmonarius* es capaz de crecer, degradar el insecticida y fructificar (Hernandez *et al.* 2006, Mendoza Orozco 2006). Por lo anterior, en el presente trabajo se estudió el crecimiento de varias cepas de este género en presencia del insecticida y se determinó la factibilidad técnica de usar el extracto de carpóforos y el SDP para degradarlo. Resultados de este tipo son de particular interés en la búsqueda de nuevas formas de descontaminar efluentes y sustratos contaminados, y de dar mayor utilidad a los productos y subproductos del cultivo comercial de setas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron diez cepas de *Pleurotus* spp (Tabla 1) proporcionadas por el Laboratorio de Hongos Tropicales de ECOSUR.

Reactivos

Solución comercial de Thiodan (Agrevo) con 35% de endosulfán; acetonitrilo y éter de petróleo (grado HPLC); estándar de endosulfán ($\alpha = 66.3\%$; $\beta = 33.5\%$) y sulfato de endosulfán (97.7%) (Pestanal).

Medios de cultivo y crecimiento

Medio de propagación (g/l): Agar (Bioxón) 16.0; peptona de caseína (Bioxón) 5.0; dextrosa anhidra 1.0 y extracto de levadura (BBL) 2.5; medio con endosulfán (g/l): agar 16.0; peptona de caseína 5.0 y 100 mg/l de endosulfán (Thiodan 35%). Para fines de comparación se utilizó como medio testigo agar (g/l) 16.0 y peptona de caseína 5.0 sin insecticida. La incubación se hizo a 25°C.

Preparación de inóculo

La semilla fue preparada inoculando la cepa *P. pulmonarius* ECS-0190 en granos de sorgo estéril (120°C, 20 minutos) e incubándola en oscuridad durante ocho días a 25°C según Quimio (2002).

Sustrato

Se usó pasto pangola *Digitaria decumbens* cortado, en tamaño de 5-10 cm, y esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Para ajustar la humedad a 70% se agregó una solución con 65 mg/kg de endosulfán esterilizada por filtración (filtros millipore de 0.2 micras) bajo condiciones de asepsia rigurosa. Se preparó un testigo sin insecticida (Hernández *et al.* 2003 y 2006).

Cultivo y fructificación

El sustrato fue mezclado asépticamente con semilla de *P. pulmonarius*, colocando 950 g de sustrato con 50 g de inóculo en capas alternas dentro de bolsas de polipapel de 35 x 25 cm. Las bolsas fueron incubadas en oscuridad a una temperatura entre 25-28°C durante 5 días, al igual que dos controles (sin *P. pulmonarius* y sin endosulfán). Se tomaron muestras de 10 g al inicio y al final de la incubación (0 y 15 días después de la siembra).

Una vez colonizado el sustrato, fue llevado a condiciones que estimularon la fructificación del hongo (80-95% humedad, 23°C). La concentración de bióxido de carbono se mantuvo menor o igual a 800 ppm y se aplicaron riegos e iluminación como lo describen Sánchez y Royse (2002). Al final de la segunda cosecha

(35 días después de la siembra), se tomó una muestra de 10 g en dos lugares diferentes del sustrato: en el centro y a un centímetro de la superficie. La concentración de endosulfán fue medida al final de la incubación y al final de la cosecha. Todas las muestras fueron realizadas por triplicado.

Extracto enzimático

Se colocaron 50 g de carpóforos de *P. pulmonarius* ECS-0190 en un vaso de precipitado y se agregaron 50 ml de acetato de sodio 0.1 M como amortiguador. La mezcla fue macerada homogeneizada y drenada. El líquido obtenido fue recuperado en un matraz de 250 ml. Este procedimiento fue repetido dos veces con lo que se obtuvo 100 ml de extracto. El extracto fue filtrado con papel Whatman número 54.

Condiciones de reacción

La mezcla para la reacción de degradación estaba compuesta por una solución de 2 ml de endosulfan (6 mg/l) y 1 ml de extracto de carpóforos. La temperatura de incubación fue 28°C y se muestreó cada 0, 5, 30, 45 y 60 minutos. La reacción fue detenida al agregar 3 ml de acetonitrilo (grado HPLC, Sigma). Se hicieron tres repeticiones por experimento.

La actividad enzimática (lacasa y peroxidasa) fue confirmada con syringaldazina 0.216 mM como sustrato (4-hidroxi-3, 5-dimethoxibezaldazine) diluido en metanol (Sigma). La mezcla de reacción fue: 2 ml amortiguador, 0.2 ml sol. syringaldazina, 0.5 ml extracto enzimático, a 28 °C. Una unidad fue definida como la cantidad de enzima que produce un cambio en la densidad óptica (ΔA) de 0.001/min a 530 nm (Dawel et al. 1997). La reacción fue detenida también con 3 ml de acetonitrilo.

Columna de degradación

Una columna para la degradación de endosulfán fue preparada con tubo de vidrio (16.5 cm largo y 2 cm diámetro), con 30 g SDP a 60% de humedad y pH 7.4. Un control fue preparado con el mismo material, pero esta columna fue esterilizada a 120 °C por 20 minutos para desnaturalizar la carga enzimática del sustrato. En cada columna se hicieron pasar 50 ml de solución acuosa de endosulfan 6 mg/l simultáneamente con ayuda de una bomba peristáltica a un flujo de 10 ml/min (tiempo de retención 8 min) y se recicló ocho veces a través de cada columna.

Variables

Tasa de extensión radial

A partir de las 48 horas de incubación en medio sólido y después cada 24 horas durante 10 días, bajo un estereomicroscopio se observó el frente de crecimiento micelial de cada colonia y con un vernier se midió el radio en centímetros. Los datos se graficaron en el tiempo y se calculó la pendiente o tasa de extensión radial con la fórmula:

$$TER = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

TER= tasa de extensión radial; x = tiempo (horas); y = radio de la colonia (mm) en el tiempo t

Contenido de endosulfán

La determinación de endosulfán se realizó por cromatografía gas-líquido, según la norma oficial mexicana (NOM 1995), siguiendo el protocolo reportado por Hernández *et al.* 2006. Se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones marca Perkin Elmer, modelo Clarus 500:

columna capilar (SPB-5) de sílice fundida de 15 m x 0.2 mm x 0.2 µm de película, y el helio como gas acarreador a una presión de 60 psi; además de las siguientes temperaturas de operación: inicial del horno 150°C, final del horno 320°C, inyector 250°C, detector 320°C, incremento por minuto 8°C. La cuantificación de α y β -endosulfán y la de sulfato de endosulfán (se) en las muestras problema se realizó mediante las fórmulas $Y_{\alpha} = 0.5319x + 9.8244$; $R^2 = 0.9406$, $Y_{\beta} = 0.4093x + 10.032$; $R^2 = 0.8758$ y $Y_{es} = 0.9342x + 6.5317$; $R^2 = 0.9991$, obtenidas de cada curva de calibración realizada con concentraciones de 10, 1.0, 0.1, 0.01 y 0.001 mg/l de α y β -endosulfán y sulfato de endosulfán, utilizando como disolvente éter de petróleo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. La separación de medias se hizo por medio de la prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa JMP 4.0 (SAS Institute 2000).

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa la tasa de extensión radial de las diez cepas de *Pleurotus* spp estudiadas. Todas las cepas crecieron en el medio que contenía endosulfán con valores de TER entre 0.265 y 0.350 cm/día. El análisis estadístico definió tres grupos: *a*, en el cual quedaron clasificadas las cepas ECS-0190, ECS-0185, ECS-184 y ECS-0128, con las TER más altas; *b*, con TER intermedias; y *c*, donde estuvieron consideradas siete del total de cepas en estudio y que conformaron el grupo estadístico con los valores más bajos de crecimiento. La reducción de la tasa de crecimiento ocasionada por la presencia de endosulfán en las cepas fue notable, y varió entre 16.2% de inhibición (cepa ECS-0105) y 47.2% (cepa ECS-140).

En la tabla 2 se observa la evolución de la concentración de endosulfán en un sustrato (*Digitaria decumbens*) previa y artificialmente contaminado con 65 mg/kg de este insecticida a los días 0 (siembra), 15 (fin de colonización) y 35 días (segunda cosecha) de cultivo de *P. pulmonarius* ECS-0190. Al día 35 la concentración era de 0.1 mg/kg (0.15%), mientras que en el control sin inocular era de 32.2 mg/kg (49.5%). En ese día se observó en el SDP la formación de 13.5 mg/kg de sulfato de endosulfán, mientras que en el control no se detectó.

Extracto de carpóforos

La figura 1 muestra la evolución de 6 mg/l endosulfán en una reacción *in vitro* cuando se expone una mezcla de extracto de carpóforos de *P. pulmonarius* en amortiguador de acetatos y endosulfán por 60 minutos. La concentración remanente de endosulfán en el tubo de prueba y en el blanco o control al cabo de ese tiempo fue 0.96 mg/l (16.4% del inicial; $\alpha = 10.2\%$ y $\beta = 6.2$) y 3.24 mg/l (54.7%), respectivamente. En presencia del extracto, la concentración del insecticida fue disminuida en 83.6%, mientras que en el control la disminución resultó 45.3%. No se detectó sulfato de endosulfán en esta prueba.

Tabla 1. Origen y tasa de extensión radial (TER) de diez cepas de *Pleurotus* spp cultivadas en agar peptona y endosulfán a 24°C durante once días; porcentaje de inhibición en relación con el mismo medio sin endosulfán

Género y Especie	Clave	Procedencia	Endosulfán (cm/día)	Testigo (cm/día)	Inhibición (%)
<i>P. djamor</i>	ECS-0104	Chiapas	0.275c	0.460cd	41.3
<i>P. djamor</i>	ECS-0105	Chiapas	0.300bc	0.365e	16.7
<i>P. djamor</i>	ECS-0128	Chiapas	0.305abc	0.515ab	41.2
<i>P. djamor</i>	ECS-0140	Chiapas	0.285c	0.535a	47.2
<i>P. ostreatus</i>	ECS-0156	Desconocida	0.295bc	0.480bcd	39.6
<i>P. sp</i>	ECS-0184	Nuevo León	0.335ab	0.505abc	34.0
<i>P. ostreatus</i>	ECS-0185	Japón	0.350a	0.500abc	30.0
<i>P. djamor</i>	ECS-0177	Chiapas	0.265c	0.450d	42.2
<i>P. pulmonarius</i>	ECS-0190	Isla Mauricio	0.345a	0.490abcd	30.6
<i>P. ostreatus</i>	ECS-0115	México, D. F.	0.300bc	0.505abc	40.0
C. V (%)		4.61		5.68	

Letras diferentes en la misma columna indican que no hay diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).
C.V. = Coeficiente de variación.

Tabla 2. Concentración de endosulfán y de sulfato de endosulfán al final de la colonización y de la fructificación (15 y 35 días después de la siembra) de *P. pulmonarius*, sobre pasto pangola *Digitaria decumbens* con 70% humedad y 65 ppm iniciales de insecticida. Testigo sin inocular, incubación a 24°C. Media de cinco repeticiones y desviación estándar

Tiempo (días)	ECS-0190		Testigo
	Endosulfán (mg/kg)	Sulfato (mg/kg)	Endosulfán (mg/kg)
0	65.00	0.00	65.00
15	2.19	8.70	38.20
35	0.10	13.50	32.20

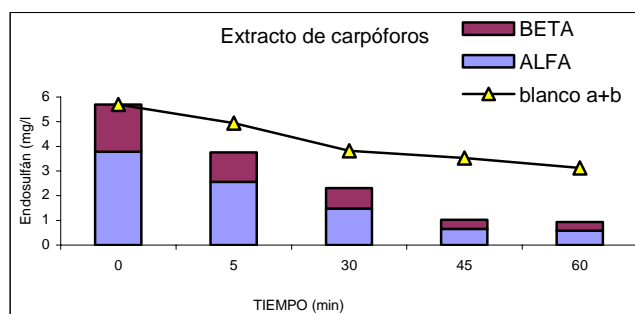


Fig. 1. Evolución del contenido de endosulfán en una mezcla de reacción al exponerla a la carga enzimática de un extracto de carpóforos de *P. pulmonarius* ECS-0190 a 28°C y pH 7.4

Extracto de SDP

La figura 2 muestra la evolución en el contenido de endosulfán en un efluente sujeto a recirculación en una columna de vidrio empacada con SDP. Después de 60 minutos de contacto quedó 0.624 mg/l (10.4 %; $\alpha=7.8$ y $\beta=2.6\%$) del contenido inicial. En el control este valor fue 3.24 mg/l (54.7%; $\alpha=38.2$ % y $\beta=16.5$ %), lo que correspondió a una disminución de 90.59% y 45.3% de endosulfán.

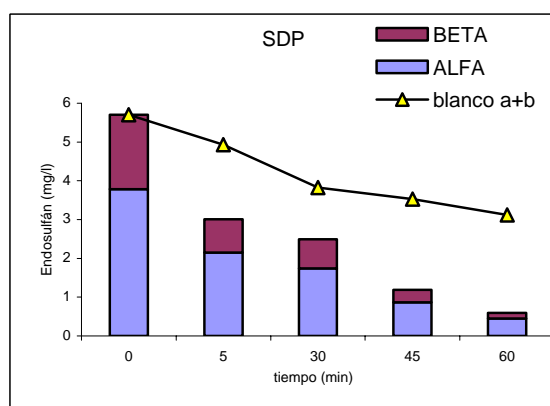


Fig. 2. Variación del contenido en endosulfán a través del tiempo en un efluente sujeto a recirculación (10 ml/min) en columna empacada con sustrato degradado por *P. pulmonarius* ECS-0190 a 28°C y pH 7.4.

DISCUSION

La capacidad ligninolítica de las cepas del género *Pleurotus* ha sido puesta en evidencia por diferentes autores y ha sido considerada la responsable de la capacidad de este género para degradar compuestos contaminantes (Bezalel *et al.* 1996a, b, 1997, Martirani *et al.* 1996, Rodríguez *et al.* 1999). En las pruebas realizadas en este trabajo se observó que todas las cepas estudiadas fueron capaces de crecer en presencia de endosulfán, aunque se apreció un efecto inhibitorio variable sobre la tasa de extensión radial, en función de las cepas (desde 16.7% para ECS-0105 hasta 47.2% para la cepa ECS-0140) en 11 días de crecimiento. El análisis estadístico distinguió como grupo sobresaliente el formado por cuatro cepas con tasas de extensión radial en presencia de endosulfán iguales o superiores a 0.305 cm/día (ECS 190, ECS-0185, ECS-0184 y ECS-0128), sin embargo otras cepas también resultaron de interés por tener porcentajes de inhibición de crecimiento, debidos al endosulfán, bajo (entre 16.7 y 40%). Esto implica altas posibilidades de elección de cepas de este género para procesos de biorremediación, lo que aumenta

las alternativas en cuanto a organismos ya reportados (Martens 1976, Martens *et al.* 1999, Katayama y Matsumura 1993, Awasthi *et al.* 1997, Guerin 1999).

En este trabajo se decidió tomar para los estudios finales la cepa de *P. pulmonarius* ECS-0190, porque coincidió con trabajos previos donde esta cepa demostró, además de su capacidad para degradar el insecticida aquí utilizado, una buena velocidad de crecimiento en medios convencionales, buena fructificación y buena calidad (Hernández *et al.* 2006, Mendoza Orozco 2006). Asimismo aquí se demostró que durante el crecimiento sobre un sustrato contaminado con endosulfán y la posterior fructificación de esta cepa, puede darse una disminución casi total de la concentración de insecticida (0.15% de la concentración inicial). Es claro que esta degradación no se explica únicamente por el metabolismo del hongo, ya que en el control el contenido inicial del insecticida también disminuyó, probablemente por la microbiota concurrente y también por efecto de factores ambientales (Hernández *et al.* 2006).

El uso de SDP para la degradación de compuestos contaminantes de difícil descomposición recibe cada día mayor atención. Esto debido al potencial de uso de la carga enzimática presente en el material y la habilidad de las ligninasas para propósitos de biorremediación (Rinker 2002). En este estudio se ha demostrado que la degradación de endosulfán tiene lugar cuando los carpóforos, micelio o SDP son usados. Con un extracto de carpóforos en medio líquido, la descomposición de endosulfán comienza y en una hora de contacto el insecticida remanente es de 16.4% (10.4% con SDP). Esto indica que la carga enzimática del hongo es capaz de contribuir de manera importante a la degradación del insecticida.

La concentración obtenida al final de los ensayos con extractos de carpóforo y SDP podría considerarse aun alta, (0.96-0.62 mg/l), puesto que por ejemplo la agencia ambiental del estado de Florida indica que el criterio de calidad del agua para el endosulfán es 0.0085 mg/l en aguas superficiales y 0.1 a 0.2 mg/l en productos agrícolas (Hengpraprom y Lee 1998). Las concentraciones de endosulfán en una columna de agua después de eventos de escurrimiento ligados a la agricultura excedieron la LC_{50} (> 0.50 mg/l) para muchos hábitats acuáticos y causaron mortalidad en peces (Awasthi *et al.* 1997). Por este motivo, mayor investigación es necesaria para alcanzar una aplicación práctica de los hongos o el SDP en esta línea.

Los experimentos con SDP reportados aquí no se dieron bajo condiciones de esterilidad, por lo cual una importante actividad bacteriana fue posible. Esto es especialmente cierto, ya que en los testigos sin inocular se observó una importante degradación del insecticida. Lo que podría deberse a factores fisicoquímicos (hidrólisis, volatilización, adsorción y absorción de endosulfán por el SDP) o por agentes biológicos (microbiota nativa). En el caso de la columna de degradación, la microbiota nativa fue eliminada del testigo durante la esterilización en autoclave. Como el experimento tuvo una duración de una hora, es probable que los factores fisicoquímicos fueran más importantes que los agentes bióticos. De todas maneras, en todos los casos la degradación resultó más evidente cuando alguna forma de biomasa de *P. pulmonarius* (carpóforos, SDP) estuvo presente. Por tanto, sugiere que la actividad enzimática de este hongo juega un papel importante en la degradación de endosulfán.

Los resultados están de acuerdo con lo reportado por Schultz *et al.* 2001, quienes indican que las lacasas fúngicas son capaces de deshalogenar bifenilos; también con Hernández *et al.* (2006), Mendoza (2006) y Escobar *et al.* (2002), estos indican que *P. ostreatus* y *P. pulmonarius* son capaces de degradar el endosulfán. En las pruebas con extracto de carpóforos y con SDP el sulfato de endosulfán no fue detectado, situación difícil de explicar porque el compuesto ha sido reportado como el mayor producto de degradación en el caso de una oxidación enzimática del endosulfán. Más estudios son necesarios para aclarar tal aspecto.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera podido ser realizado sin el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt, Proyecto 34199B). El apoyo del Dr. R. Bello, MC René Andrade, QFB Lilia Moreno, QA Antonio Santiesteban y del Sr. Gerardo Hernández fue indispensable para completar el estudio. Por último, se agradece el apoyo del MC. Javier Valle en los análisis estadísticos.

REFERENCIAS

- Awasthi, N., Manickam, N., y Kumar, A. 1997 Biodegradation of endosulfan by a bacterial coculture. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59, 928-934.
- Batista, J.G., E.R.B. Batista and F.F. Mateus. 2000. Effectiveness of two biodegradation methods on the physical characteristics of compost for horticultural purposes. *Acta Horticulturae* 517:293-302.
- Benítez, J.A. & Barcenas, C. 1996 Patrones de uso de los pesticidas en la zona costera del golfo de México. In: Golfo de México; Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias ed. Botello, A.V.: EPOMEX Serie científica 5, Universidad Autónoma de Campeche, México pp. 155-167.
- Bezalel, L., Hadar, Y. y Cerniglia, C.E. 1996 Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 292-295.
- Bezalel, L., Hadar, Y. y Cerniglia, C.E. 1997 Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2495-2501.
- Dawel, G., M Kastner, J Michels, W Poppitz, W Gunther and W Fritsche. 1997. Structure of a laccase-mediated product of coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. *Appl.Env. Microbiol.* 63,7,2560-2565.
- De León-Monzón, J.H., J. E. Sánchez, J. Nahed-Toral. 2004. El cultivo de *Pleurotus ostreatus* en los altos de Chiapas, México. *Rev. Mex. Mic.* 18, 31-38
- Dhar, B.L., Ahlawat, P., Hanth, A., & Dubey, J.K. 2004 Organic mushroom production through improved substrate fermentation process and cultural practices. *Mushroom Science* 16, 289-295.
- Escobar, V.M., Nieto, M.G., Sánchez, J.E. y Cruz, L. 2002 Effect of endosulfán on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* and *Auricularia fuscusuccinea* in liquid culture. In Sánchez JE, Huerta G, Montiel E (eds) *Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the fourth International Conference*. Universidad Autónoma del Estado de México. Cuernavaca. 399-408 ISBN 9-688-78105-3.
- Guerin, T.F. 1999 The anaerobic degradation of endosulfan by indigenous microorganisms from low-oxygen soils and sediments. *Environmental Pollution*. 106, 13-21.
- Guillén-Navarro, G.K., Márquez-Rocha, F.J. y Sánchez-Vázquez J.E. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:302-306.
- Gunther, F.A. y Jeppson, L.R. 1975 *Insecticidas modernos y la producción mundial de alimentos*. 4a. Edición. C.E.C.S.A. México D.F. 165p.
- Hengpraprom, S. y C. Lee. 1998. *Environmental Engineering and Science*, Clemson University. 1-15.
- Hernández, D., J.E. Sánchez, M. G. Nieto and F. J. Márquez-Rocha. 2006. Degradation of endosulfan during substrate preparation and cultivation of *Pleurotus pulmonarius*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22(7):753-760.
- Hernández, D., Sánchez, J.E., & Yamasaki, V.K. 2003 Composting, a simple procedure for preparing substrate for cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology* 90(2), 145-150
- INSP 2005 Instituto Nacional de Salud Pública. El campo mexicano. Una bomba de tiempo tóxica. http://www.insp.mx/2005/noticias/noticia020605_3.htm Marzo 29, 2006.
- Katayama, A. & Matsumura, F. 1993 Degradation of organochlorine pesticides particularly endosulfan by *Trichoderma harzianum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1059-1065.
- Kullman, S.W. & Matsumura, F. 1996 Metabolic pathway utilized by *Phanaerochete chryssosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 593-600
- La Jornada. 2000. Endosulfán. <http://www.jornada.unam.mx/2000/10/30/eco-g.html> 29 de marzo 2006.
- Martens, R. 1976 Degradation of 8-9-carbon-14] endosulfan by soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 853-858
- Martens, R., Wolter, M., Bahadir, M. y Zadrazil, F. 1999 Mineralization of C-labelled highly-condensed polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by *Pleurotus* sp. Florida. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1893-1899.

- Martirani, L., P. Giardina, L. Marzullo and G. Sannia. 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 30(8):1914-1918.
- Matsumura, F. 1980 *Toxicology of Insecticides*. 3rd Edition. Plenum Press. New York. 63-64,205 ISBN-0306307871.
- Mendoza-Orozco, G.M. 2006. Degradación de endosulfán por *Pleurotus* spp. Universidad autónoma de Chiapas. Tesis de maestría. 70p
- NOM 1995. NOM-021 ZOO-1995. Norma Oficial Mexicana. México, D.F.
- Quimio, T. 2002. *La preparación de semilla*. In: J.E. Sánchez, and D.J. Royse (eds). *La biología y el cultivo de Pleurotus spp. ECOSUR-UTEHA. México. D.F.*
- Rinker, D. L., 2002. Handling and using “spent” mushroom substrate around the world. In: J.E. Sánchez, G. Huerta, E. Montiel (Eds), *Proceed. of the fourth Int. Conf. Mush. Biol. Mush. Products*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, 43-60.
- Rodríguez, E., Pickard, M.A. y Vázquez-Duhalt, R. 1999 Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38, 27-32.
- Sánchez, J.E. & Royse, D.J. 2002 La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. pp 141-156. UTEHA – ECOSUR. México, DF ISBN 9-681-86357-7.
- SAS Institute. 2000 JMP 4.0 Statistical discovery software. SAS Campus Drive Cary, NC 27513 USA. ISBN 1-58025-631-7.
- Schultz, A., U. Jonas, E. Hammer y F. Schauer. 2001. Dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by fungal laccase *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 9, 4377-4381.