



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

**“Estudio de los mecanismos de remoción de
pentaclorofenol por *Rhizopus oryzae* ENHE”**

T E S I S

Para obtener el grado de:

Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A :

M. en B. Héctor Hugo León Santiesteban

DIRECTORES:

Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Dr. Sergio Revah Moiseev

ASESOR:

Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

México, D.F

Julio 2014

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de **Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario** del Departamento de Biotecnología, perteneciente a la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Este trabajo fue financiado por CONACYT a través de la beca de doctorado No. 47943

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

Iztapalapa, D.F a 3 de Julio del 2014

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**“Estudio de los mecanismos de remoción de pentaclorofenol por
Rhizopus oryzae ENHE”**

Que presentó

M. en B. Héctor Hugo León Santiesteban

Comité Tutorial.

Directora: Dra. Araceli Tomasini Campocosio

Co-Director: Dr Sergio Revah Moiseev

Asesor: Dr Kazimierz Wrobel Zasada


Jurado:

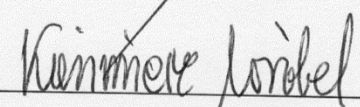
Presidente: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez


Secretario: Dr Kazimierz Wrobel Zasada

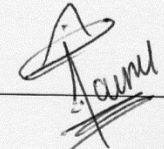
Vocal: Dr Alba Mónica Montiel González

Vocal: Dr Jaime Marcial Quino









*Sin ustedes en mi vida jamás hubiera llegado hasta aquí.
Gracias abues, Rosenda León Contreras y Ardelio León Contreras, por todo su
amor y sacrificios.
Este trabajo va dedicado a su memoria.*

Agradecimientos

Siento una sensación muy inusual, no es indigestión, creo que debe de ser gratitud (Benjamin Disraeli)

A la Dra. Araceli Tomasini Campocosio por haberme guiado en esta aventura; y sobre todo, por haber confiado en mí. Siempre le estaré agradecido.

Al Dr. Sergio Revah Moiseev por haberme orientado y aconsejado para que esta investigación saliera adelante.

Al Dr. Kazimierz Wrobel Zasada por el apoyo que me brindó, el conocimiento que me transmitió y la amistad que me otorgó.

A los doctores Refugio Rodríguez Vázquez, Alba Mónica Montiel González y Jaime Marcial Quino por haber contribuido a que la calidad de este documento incrementara considerablemente.

A toda mi familia por el apoyo que me han brindado, y que afortunadamente me siguen proporcionando. Gracias por aguantarme y concederme su amor incondicional.

A Wylma Dolores Pérez Pérez (medio círculo) por su amor, comprensión y compañía. Gracias por estar a mí lado.

A mis amigos: Alma Lilia Toledo Cervantes, Arisai del Carmen Hernández Sámano, Nancy Cristal Zúñiga Peña, José Eduardo Jiménez Rodríguez (el pan) y todos los Torres por su amistad y todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A mis compañeros del laboratorio de Ingeniería genética y metabolismo secundario por su apoyo y amistad.

Al banco Santander México por otorgarme la beca de movilidad Santander ECOES para estancias de movilidad nacional 2012-1.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado una beca durante mis estudios de doctorado.

Índice general

1	Introducción	1
1.1	Pentaclorofenol, usos y efectos tóxicos	1
1.2	Biosorción	4
1.3	Biomasa fúngica como matriz para la biosorción.....	6
1.4	Punto de carga cero (<i>pzc</i>) de un sorbente.....	7
1.5	Isotermas de sorción	7
1.5.1	Isoterma de Langmuir.....	8
1.5.2	Isoterma de Freundlich	8
1.5.3	Isoterma de Redlich-Peterson.....	9
1.6	Cinéticas de sorción	9
1.6.1	Ecuación de pseudo-primer orden	10
1.6.2	Ecuación de pseudo-segundo orden	11
1.7	Mecanismos de degradación de PCF con hongos.....	12
1.7.1	Degradación por basidiomicetos	12
1.7.2	Degradación de clorofenoles con hongos no basidiomicetos.....	19
1.7.2.1	Degradación por ascomicetos	21
1.7.2.2	Degradación por zigomicetos	22
2	Antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos.....	27
2.1	Antecedentes	27
2.2	Justificación	30
2.3	Hipótesis	30
2.4	Objetivo general.....	30
2.4.1	Objetivos particulares.....	30
3	Sorción de PCF en biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	31
3.1	Metodología experimental	31
3.2	Materiales y métodos	32
3.2.1	Obtención de esporas de <i>R. oryzae</i> ENHE	32
3.2.2	Concentración, lavado y conteo de esporas de <i>R. oryzae</i> ENHE	32

3.2.3	Medio Merlin-Norkran enriquecido	33
3.2.4	Producción de biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE	33
3.2.5	Inactivación de la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	33
3.2.6	Determinación del punto de carga cero (pH_{pzc}).....	34
3.2.7	Experimentos de biosorción de PCF	35
3.2.7.1	Experimentos cinéticos de biosorción	36
3.2.7.2	Experimentos de isotermas de sorción.....	36
3.2.8	Efecto de la Temperatura en la biosorción de PCF	36
3.2.9	Evaluación de los resultados experimentales con los modelos teóricos.....	37
3.3	Métodos analíticos	37
3.3.1	Cuantificación de PCF.....	37
3.3.2	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	37
3.4	Resultados	38
3.4.1	Estudios de cambios de pH.....	38
3.4.2	Determinación del <i>pzc</i> de la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	38
3.4.3	Estudios cinéticos de biosorción de PCF.....	40
3.4.4	Estudios de isotermas	42
3.4.4.1	Isotermas de sorción de PCF con biomasa seca.....	42
3.4.4.2	Isotermas de sorción de PCF con biomasa húmeda.....	44
3.4.5	Efecto de la temperatura sobre la biosorción de PCF en biomasa seca.....	47
3.4.6	Grupos funcionales presentes en la biomasa seca de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	48
3.5	Discusión	51
3.6	Conclusiones	56
4	Respuesta metabólica a la presencia de PCF en los cultivos de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	57
4.1	Metodología experimental	57
4.2	Materiales y métodos	57
4.2.1	Medio de cultivo Lee doblemente concentrado (2X).....	57
4.2.2	Análisis respirométricos	58
4.2.3	Biodegradación de PCF.....	58
4.3	Métodos analíticos	59
4.3.1	Cuantificación de CO ₂ y O ₂	59

4.3.2	Pre-tratamientos de muestras de medio de cultivo y biomasa.....	59
4.3.2.1	Extracción de PCF e intermediarios clorados del medio de cultivo	60
4.3.2.2	Extracción de PCF e intermediarios clorados de la biomasa.....	61
4.3.3	Derivatización de clorofenoles	61
4.3.4	Identificación de los intermediarios de la degradación de PCF	62
4.3.4.1	Cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones ..	62
4.3.4.2	Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.....	63
4.3.5	Cuantificación de las fuentes de carbono	64
4.3.5.1	Cuantificación de glucosa (Glc).....	64
4.3.5.2	Cuantificación de ácido glutámico (Glu).....	64
4.3.5.2.1	Derivatización de Glu	66
4.3.5.2.2	Preparación de la solución de <i>o</i> -ftalaldehído (OPA).....	66
4.3.6	Cuantificación de las fuentes de nitrógeno.....	66
4.3.6.1	Cuantificación de amonio (NH ₄ ⁺).....	67
4.3.6.2	Cuantificación de nitratos (NO ₃ ⁻).....	67
4.4	Resultados	67
4.4.1	Efecto del PCF sobre la respiración de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	67
4.4.2	Pérdida abiótica de PCF	70
4.4.3	Efecto del PCF sobre el metabolismo de <i>R. oryzae</i> ENHE.....	71
4.4.3.1	Respuesta metabólica de <i>R. oryzae</i> ENHE al PCF utilizando Glc y (NH ₄) ₂ SO ₄ como fuentes de carbono y nitrógeno	72
4.4.3.1.1	Biodegradación de 0.5 mg de PCF.....	77
4.4.3.1.2	Biodegradación de 2 mg de PCF.....	78
4.4.3.2	Respuesta metabólica de <i>R. oryzae</i> ENHE al PCF utilizando Glu y NaNO ₃ como fuentes de carbono y nitrógeno.....	85
4.4.3.2.1	Biodegradación de 0.5 mg de PCF.....	89
4.4.3.2.2	Biodegradación de 2 mg de PCF.....	91
4.5	Discusión	94
4.6	Conclusiones	102
5	Remoción de PCF por <i>R. oryzae</i> ENHE en un biorreactor de tanque agitado.....	104
5.1	Metodología experimental	104

5.2	Materiales y métodos	105
5.2.1	Biorreactor	105
5.2.2	Transformación enzimática <i>in vitro</i> del PCF.....	105
5.2.3	Pre-tratamiento de muestras y cuantificación de PCF e intermediarios.....	106
5.3	Resultados	106
5.4	Discusión	109
5.5	Conclusiones	111
6	Recomendaciones.....	112
7	Referencias	113
8	Anexos.....	125

Índice de tablas

Tabla 1.1 Resumen de usos legales del PCF por algunos países.....	2
Tabla 1.2 Balance de masa de ¹⁴ C-PCF en los cultivos de <i>P. chrysosporium</i> en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno reportado por Mileski <i>et al.</i> , [50]. Después del cuarto día de cultivo se colocó el ¹⁴ C-PCF. Balance de masa realizado al sexto día de cultivo.	12
Tabla 3.1 Cambios de pH durante el proceso de sorción de PCF por la biomasa inactiva de <i>R. oryzae</i> ENHE	38
Tabla 3.2 Parámetros cinéticos de biosorción y estadísticos calculados por regresión no lineal para la sorción de PCF en biomasa seca de <i>R. oryzae</i> ENHE usando diferentes pH. 41	
Tabla 3.3 Parámetros de isotermas de sorción y estadísticos calculados por medio de regresión no lineal para la sorción de PCF por la biomasa seca de <i>R. oryzae</i> ENHE a diferentes valores de pH.	42
Tabla 3.4 Parámetros de sorción de PCF de la biomasa húmeda de <i>R. oryzae</i> ENHE obtenidos por regresión no lineal de los resultados experimentales con los modelos teóricos de Langmuir y Freundlich.	45
Tabla 3.5 Bandas encontradas en los espectros IR de la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE en presencia y ausencia de PCF.	50
Tabla 4.1 Parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en medio de cultivo Lee 2X con Glc-(NH ₄) ₂ SO ₄	76
Tabla 4.2 Intermediarios de la degradación de PCF encontrados en la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE con una edad de 264 h.....	80
Tabla 4.3 Parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de <i>R. oryzae</i> ENHE en medio de cultivo Lee 2X con Glu-NaNO ₃ como fuentes de carbono y nitrógeno.	89

Índice de figuras

Figura 1.1 Modelo metabólico propuesto Li y Wang [51] en la degradación de PCF por *P. chryso sporium*. E1: enzimas extracelulares para la conversión de PCF a intermediarios. E2: enzimas intracelulares para la conversión de intermediarios a CO₂. E3: Enzimas intracelulares relacionadas a la degradación directa de PCF. E4: glucosa oxidasa intracelular. E5: Enzimas relacionadas en la producción de sustratos para las enzimas E6. E6: oxidasas extracelulares para la producción de H₂O₂. I: intermediario principal de la degradación de PCF. PM: productos metabólicos usados para la producción de H₂O₂. 13

Figura 1.2 Ruta de degradación PCF por *P. chryso sporium* propuesta por Reddy y Gold [52]. Donde I: PCF; II: tetracloro-*p*-benzoquinona; III: tetracloro-1,4-dihidroxibenceno; IV: pentacloroanisol; V: 2,3,6-tricloro-1,4-dihidroxibenceno; VI: 2,3,6-tricloro-1,4,5-trihidroxibenceno; VII: diclorotrihidroxibenceno; VIII: 2-cloro-1,4,5-trihidroxibenceno; XI: 2,5-dicloro-1,4-dihidroxibenceno; XIV: 2-cloro-1,4-dihidroxibenceno; XVIII: 1,2,4-trihidroxibenceno. 14

Figura 1.3 Deshalogenación reductiva de TCHQ a triclorohidroquinona vía un intermediario conjugado, GS- triclorohidroquinona propuesta por Reddy y Gold. [53] 16

Figura 1.4 Intermediarios formados durante de la reacción enzimática de lacasa con el PCF. Donde I: pentaclorofenol; II: tetracloro-*p*-benzoquinona; III: tetracloro-*o*-benzoquinona. . 17

Figura 1.5 Intermediarios formados durante la degradación de PCF en los cultivos de *A. discolor* en suelo lodoso. Donde I: pentaclorofenol; II: pentacloroanisol; III: tetraclorohidroquinona; IV: tetracloro-1,4-dimetoxibenceno; V: 2,5-dicloro-1,4-dimetoxibenceno; VI: 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno; VII: 3,4-dimetoxibenzaldehído. Los compuestos I, II, V, VI y VII fueron cuantificados en los experimentos de degradación de PCF. Mientras que los compuestos III y IV fueron inferidos en base a los compuestos encontrados experimentalmente durante la degradación de PCF [61]. 18

Figura 1.6 Intermediarios formados durante la degradación de 2,4-DCF con *Mortierella sp* [72]. Donde I: 2,4-diclorofenol; II: clorohidroquinona; III: 3,5-diclorocatecol; IV: 3,5-dicloroguaicaol; V: 4,6-dicloroguaiacol. 23

Figura 1.7 Esquema de reacción en la degradación de PCF por *M. ramosissimus* IM 6203 [74]. Donde I: pentaclorofenol; II: tetraclorohidroquinona; III: 2,3,5,6-tetraclorofenol; IV: 2,3,5,6- tetraclorometoxibenceno; V: pentaclorobenceno; VI: pentacloroanisol; VII: pentacloroetoxibenceno; VIII: 2,3,4,6- tetraclorofenol. 24

Figura 1.8 Visión esquemática de la degradación de PCF por <i>M. plumbeus</i> [76]. Donde I: pentaclorofenol; II: tetraclorohidroquinona; III: 2,3,6-triclorohidroquinona.	26
Figura 3.1 Diagrama de flujo donde se muestran los experimentos de sorción de PCF realizados con biomasa sin actividad metabólica de <i>R. oryzae</i> ENHE.	32
Figura 4.1 Representación esquemática de las etapas del tratamiento realizado a las muestras del medio de cultivo y biomasa liofilizada de <i>R. oryzae</i> ENHE.	60
Figura 4.2 Etapas del pre-tratamiento realizado a las muestras de medio de cultivo para la cuantificación de Glu.....	65
Figura 4.3 Esquema simplificado donde se muestran las condiciones experimentales que se realizaron para estudiar la respuesta metabólica de <i>R. oryzae</i> ENHE al PCF.....	72
Figura 4.4 Fragmentación del 2,3,4,6-tetraclorofenol.	83
Figura 4.5 Fragmentación de pentaclorofenil 2-hidroxipropionato (lactato de PCF).	85
Figura 5.1 Diagrama de flujo donde se sintetiza las actividades realizadas durante el estudio de remoción de PCF con <i>R. oryzae</i> ENHE en un STR.....	104

Índice de gráficos

Gráfico 3.1 Curvas de titulación experimentales obtenidas por el método de titulación de masa potenciométrica (PMT) para la determinación del *pzc* de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. (□) Blanco sin biomasa; (●) 5.4 mg de biomasa en 100 mL de KNO₃; (▲) 8.2 mg de biomasa en 100 mL de KNO₃ y (◆) 10.2 mg de biomasa en 100 mL de KNO₃. 39

Gráfico 3.2 Efecto del pH sobre la velocidad de sorción de PCF en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE usando el modelo cinético de pseudo-segundo orden. (□) pH 5.0; (○) pH 6.0 y (Δ) pH 8.0. 40

Gráfico 3.3 Capacidad de sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE en función del pH de la fase acuosa modelada con la isoterma de Redlich-Peterson. (□) pH 5.0; (○) pH 6.0 y (Δ) pH 8.0. 43

Gráfico 3.4 Capacidad de sorción de PCF por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 3.3. Ajuste de los resultados experimentales con la isoterma de Langmuir. 44

Gráfico 3.5 Capacidad de sorción de PCF por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 7.5. Ajuste de los resultados experimentales con la isoterma de Freundlich. 46

Gráfico 3.6 Cambios de la energía libre de Gibbs *versus* la temperatura en la biosorción de PCF en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. 48

Gráfico 3.7 Espectros FT-IR de biomasa seca de *R. oryzae* ENHE en presencia (—) y ausencia (---) de PCF. Tanto la biomasa con PCF como la biomasa control estuvieron resuspendidas en una solución a pH 5.0. 49

Gráfico 4.1 Cinética de producción de CO₂ y consumo de O₂ durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE con PCF como única fuente de carbono. (■, □) cultivos con 0.01 mg de PCF (1 mg L⁻¹); (●, ○) cultivos con 0.05 mg de PCF (5 mg L⁻¹); (■, ●) CO₂; (□, ○) O₂. 68

Gráfico 4.2 Producción de CO₂ y consumo de O₂ durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE con 5 g Glc L⁻¹ y PCF. (■) cultivos con 0.05 mg de PCF (5 mg L⁻¹); (●) cultivos con 0.08 mg de PCF (8 mg L⁻¹); (▲) cultivos con 0.125 mg de PCF (12.5 mg L⁻¹); (□) cultivos control, sin PCF. 69

Gráfico 4.3 Consumo de Glc por *R. oryzae* ENHE durante los cultivos con 5g Glc L⁻¹ y PCF. Glc fue cuantificada en un analizador bioquímico YSI. (■) cultivos con 0.05 mg de

PCF (5 mg L ⁻¹); (●) cultivos con 0.08 mg de PCF (8 mg L ⁻¹); (▲) cultivos con 0.125 mg de PCF (12.5 mg L ⁻¹); (□) cultivos control, sin PCF.....	70
Gráfico 4.4 Cinética de eliminación abiótica de PCF en el medio Lee 2X.....	71
Gráfico 4.5 Cinéticas de crecimiento (A), consumo de Glc (B) y pH (C) durante los cultivos de <i>R. oryzae</i> ENHE en medio Lee 2X con Glc-(NH ₄) ₂ SO ₄ y PCF. (○) Cultivos control; (■) con 0.5 mg de PCF; (▲) con 2 mg de PCF.....	75
Gráfico 4.6 Perfil cinético de NH ₄ ⁺ durante los cultivos de <i>R. oryzae</i> ENHE en presencia de PCF. (■) 0.5 mg de PCF; (▲) 2 mg de PCF; (□) control sin PCF.....	76
Gráfico 4.7 PCF cuantificado en el medio de cultivo durante la biodegradación de 0.5 mg de PCF en medio Lee 2X con Glc-(NH ₄) ₂ SO ₄	78
Gráfico 4.8 PCF cuantificado en el medio de cultivo durante la biodegradación de 2 mg de PCF en medio Lee 2X con Glc-(NH ₄) ₂ SO ₄	79
Gráfico 4.9 Intermediarios de la degradación de PCF cuantificados en las muestras de medio de cultivo. Medio de cultivo Lee 2X con Glc, (NH ₄) ₂ SO ₄ y 2 mg de PCF. (□) TCHQ y (■) 3,4,5-TCF	79
Gráfico 4.10 Cromatograma de los intermediarios de la degradación de PCF encontrados en la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE producida con Glc, (NH ₄) ₂ SO ₄ y 2 mg de PCF. Biomasa con una edad de 264 h. (—) Biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE en presencia de PCF; (---) Biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE control, sin PCF; (—) Estándares.....	81
Gráfico 4.11 Cromatograma obtenido por TIC en GC-EI-qMS de la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE producida con Glc, (NH ₄) ₂ SO ₄ y 2 mg de PCF.....	82
Gráfico 4.12 Espectro de masas del derivado acetilado de 2,3,4,6-TCF. Abundancia relativa del 65%.....	83
Gráfico 4.13 Cromatograma GC-EI-qMS obtenido del segundo intermediario de la degradación de PCF encontrado en la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE, con una <i>m/z</i> de 323 (A). Espectro de masas del compuesto anterior (B).....	84
Gráfico 4.14 Cinéticas de crecimiento (A), consumo de Glu (B) y pH (C) durante los cultivos de <i>R. oryzae</i> ENHE en medio Lee 2X con Glu-NaNO ₃ y PCF. (○) Cultivos control; (■) con 0.5 mg de PCF; (▲) con 2 mg de PCF.....	87

Gráfico 4.15 Perfil cinético de NO_3^- durante los cultivos de <i>R. oryzae</i> ENHE en presencia de PCF. (■) 0.5 mg de PCF; (▲) 2 mg de PCF; (□) control sin PCF.	88
Gráfico 4.16 PCF cuantificado en el medio de cultivo durante la biodegradación de 0.5 mg de PCF en medio Lee 2X con Glu- NaNO_3	90
Gráfico 4.17 Cromatograma obtenido de la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE producida con Glu, NaNO_3 y 0.5 mg de PCF. Biomasa con una edad de 436 h. (—) Biomasa que estuvo en contacto con PCF; (---) biomasa control sin PCF.	91
Gráfico 4.18 PCF cuantificado en el medio a diferentes tiempos de cultivo de <i>R. oryzae</i> ENHE en medio con Glu, NaNO_3 y 2 mg de PCF.	91
Gráfico 4.19 PCA cuantificados en el medio de cultivo con respecto al tiempo en los cultivos con Glu, NaNO_3 y 2 mg de PCF.	92
Gráfico 4.20 Cromatograma obtenido del medio de cultivo con Glu, NaNO_3 y 2 mg de PCF. (—) medio de cultivo de 144 h, sin PCF; (—) medio de cultivo de 388 h en presencia de PCF; (—) estándares.	93
Gráfico 4.21 Cromatograma obtenido de la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE producida con Glu, NaNO_3 y 2 mg de PCF. Biomasa con una edad de 436 h. (—) Biomasa que estuvo en contacto con PCF; (---) Biomasa control sin PCF; (—) estándares. A: 3,4,5-TCF; B: Desconocido; C: TCHQ.	94
Gráfico 4.22 Intermediarios de la degradación de PCF cuantificados dentro de las biomásas producidas con Glc- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Glu- NaNO_3 y con 2 mg de PCF, a las 264 y 436 h, respectivamente. (□) medio Lee 2x con Glc- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (■) medio Lee 2x con Glu- NaNO_3	100
Gráfico 5.1 PCF cuantificado en el medio de cultivo en el STR durante la biodegradación de 32 mg de PCF con Glu como fuente de carbono.	107
Gráfico 5.2 Cromatograma obtenido de la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE producida con Glu, NaNO_3 y 32 mg de PCF en un STR. (—) biomasa que estuvo en contacto con PCF; (---) biomasa control sin PCF; (—) estándares de 3,4,5-TCF y TCHQ.	107
Gráfico 5.3 Posibles moléculas cloradas observados en la biomasa de <i>R. oryzae</i> ENHE. A) Fracción no lipídica. B) Fracción lipídica. (—) cromatograma obtenido después de la reacción de PCF con HRP; (—) cromatograma obtenido de los extractos de biomasa en	

presencia de PCF; (---) cromatograma obtenido de los extractos de biomasa control, sin PCF..... 108

Abreviaturas

2,3,4,6-TCF	2,3,4,6-tetraclorofenol
2,3,5-6-TCMB	2,3,5-6-tetraclorometoxibenceno o tetracloroanisol
2,3,5-6-TCF	2,3,5-6-tetraclorofenol
2,3,6-TrCHQ	2,3,6-Triclorohidroquinona
2,4,6-TCF	2,4,6-triclorofenol
2,4-DCF	2,4-diclorofenol
3,4,5-TCF	3,4,5-triclorofenol
4-CF	4-clorofenol
Abs	absorbancia
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosín trifosfato
PDA	agar papa y dextrosa
H₂O_d	agua destilada
ΔG^0	cambio de la energía libre de Gibbs estándar
ΔH^0	cambios en la entalpia estándar
ΔS^0	cambios en la entropía estándar
K_F	capacidad de sorción (mg g ⁻¹)(L mg ⁻¹) ^{1/n}
cm	centímetros
R²	coeficiente de determinación
K_{ow}	coeficiente de reparto octanol-agua
K	constante de equilibrio
K	Kelvin
B	constante de Redlich-Peterson
g	constante de Redlich-Peterson (l mg ⁻¹) ^{1/n}
R	constante universal de los gases
CO₂	dióxido de carbono
Glc	glucosa
Glu	ácido glutámico
GSH	glutación
GSCR	glutación reductasa de conjugación
GTS	glutación transferasa
°C	Grados Celsius
g	gramos
h	horas
1/n	índice de heterogeneidad
kg	kilogramo
LiP	lignina peroxidasa
L	litros
pKa	logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido débil
λ	longitud de onda (nm)
$\lambda_{m\acute{a}x}$	longitud de onda máxima (nm)
MnP	manganeso peroxidasa

<i>m</i>	masa (g)
SAM	metiltransferasa dependiente de <i>S</i> -adenosil-L-metionina
m	metros
μL	microlitros
μm	micrómetros
mg	miligramos
mL	mililitros
mm	milímetros
min	minutos
nm	nanómetros
<i>e</i>	número de Euler
g	número de ges o fuerza centrífuga relativa
<i>o-</i>	<i>orto</i>
OPA	<i>orto</i> -ftalaldehído
<i>p-</i>	<i>para</i>
PCA	Pentacloroanisol o pentaclorometoxibenceno
PCB	pentaclorobenceno
PCEB	pentacloroetoxibenceno
PCF	pentaclorofenol
PCNB	pentacloronitrobenceno
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
pH_{pzc}	pH donde se encuentra el <i>pzc</i>
%	porcentaje
pH	potencial de hidrógeno
PHD	prolina deshidrogenasa
v/v	relación volumen/volumen
Y_{x/s}	rendimiento biomasa-sustrato
rpm	revoluciones por minuto
<i>α</i>	significancia
T	temperatura absoluta (Kelvin)
TeCV	teracloroveratrol
TCHQ	tetracloro-1,4-dihidroxibenceno o tetraclorohidroquinona
TeCG	tetracloroguaiacol
TC_oBQ	tetracloro- <i>o</i> -benzoquinona
TC_pBQ	tetracloro- <i>p</i> -benzoquinona
<i>t</i>	tiempo
TEM	trietilamina
χ²	valor de Chi cuadrada
μ	velocidad de crecimiento específico
h	velocidad de sorción inicial
q_s	velocidad específica de consumo de sustrato
V	volumen (L)
β-ME	β-mercaptoetanol
P5CDH	Δ ¹ -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa
k₂	constante de velocidad de pseudo-segundo orden (g mg ⁻¹ min ⁻¹)
q_t	capacidad de sorción de PCF cualquier tiempo (mg g ⁻¹)
q_e	capacidad de sorción de PCF en el equilibrio (mg g ⁻¹)

q_t	capacidad de sorción en cualquier tiempo (mg g^{-1})
q_e	capacidad de sorción en el equilibrio (mg g^{-1})
q_m	capacidad máxima de sorción (mg g^{-1})
C_t	concentración de PCF en cualquier tiempo (mg L^{-1})
C_e	concentración de PCF en el equilibrio (mg L^{-1})
C_0	concentración de PCF inicial (mg L^{-1})
K_a	constante de equilibrio de Langmuir (L mg^{-1})
A	constante de Redlich-Peterson (L g^{-1})
k_1	constante de velocidad de pseudo-primer orden (min^{-1})
M	molar (mol L^{-1})
N	normalidad (número de equivalentes L^{-1})
mM	milimolar ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)
log	logaritmo base 10
g L⁻¹	gramos por litro
mg L⁻¹	miligramos por litro o partes por millón
mL min⁻¹	mililitros por minuto
2X	doblemente concentrado
¹⁴CO₂	dióxido de carbono marcado radiactivamente con carbono 14
¹⁴C-PCF	pentaclorofenol marcado radiactivamente con carbono 14

Acrónimos

ATR	Attenuated Total Reflectance
CINVESTAV	Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del I.P.N
CICOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DAD	Diode Array Detector
ECD	Electron Capture Detector
EI	Electron Ionization
EEA	European Economic Area
EU	European Union
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC	Gas Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
IS	Internal Standard
qMS	Quadrupole Mass Spectrometry
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>pzc</i>	point of zero charge
PMT	Potentiometric mass titration
RI	Refractive Index
STR	Stirring Tank Reactor
TCD	Thermal Conductivity Detector
TIC	Total Ion Count
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency

Resumen

La contaminación ambiental por pentaclorofenol (PCF) fue un fenómeno que inició a principios del siglo XX y que continúa actualmente por su naturaleza recalcitrante. Los hongos han sido una fuente microbiana con un gran potencial para eliminar este xenobiótico, ya que pueden removerlo por procesos físicos-químicos y también mineralizarlo, en el mejor de los casos. *Rhizopus oryzae* ENHE (CDBB-H-1877), un zigomiceto aislado de un suelo contaminado con PCF, es un hongo filamentososo que por lo menos puede remover al PCF por medio de tres mecanismos; dos de ellos involucran la degradación parcial del clorofenol y dependen del metabolismo del hongo.

La biosorción fue el principal mecanismo de remoción de PCF. Con biomasa seca y pulverizada la sorción fue reversible, dependiente de la temperatura y se favoreció a pH 5 donde la capacidad máxima de sorción fue 16.99 mg PCF g⁻¹ biomasa. Con biomasa húmeda, la capacidad máxima de sorción aumentó a 37.09 mg PCF g⁻¹ biomasa a pH 3.3.

La metilación y la dechloración (oxidativa y reductiva) son mecanismos metabólicos utilizados por *R. oryzae* ENHE para disminuir el efecto tóxico del PCF. Sin embargo, la presencia de este xenobiótico en los cultivos del hongo afectó su capacidad respiratoria, su crecimiento, el rendimiento biomasa-sustrato, su velocidad específica de crecimiento y el consumo de las fuentes de carbono. Se demostró que la degradación del PCF se lleva a cabo principalmente al interior de las células y escasamente en el caldo de cultivo. En un medio mínimo con 2 mg de PCF, glucosa y (NH₄)₂SO₂, como fuentes de carbono y nitrógeno, *R. oryzae* ENHE produjo 0.116 µg de pentacloroanisol, 10.46 µg de compuestos aromáticos clorados y 6 compuestos más, uno de ellos parece ser 2,3,4,6-tetraclorofenol. Se encontraron indicios de que el otro compuesto es un lactato del PCF y los otros 4 no fueron identificados. Sin embargo, al utilizar al ácido glutámico y NaNO₃ como fuentes de carbono y nitrógeno, el hongo produjo 6.81 µg de pentacloroanisol, 2.89 µg de compuestos aromáticos clorados, un compuesto no identificado en la biomasa y tres compuestos no identificados en el caldo de cultivo, éstos últimos con un nivel bajo de detección. También se cultivó a *R. oryzae* ENHE en un reactor de tanque agitado, los resultados preliminares indicaron que posiblemente algunos intermediarios de la degradación de PCF pueden unirse

entre sí formando estructuras diméricas y/o poliméricas cloradas. Por lo que es necesario ampliar la investigación para obtener conclusiones concretas sobre este tema. Sin embargo, es claro que algunas variables de cultivo controlables en un reactor, tales como: aireación y agitación pueden influir en la formación de productos de degradación de PCF que no son fácilmente observables en un cultivo en matraz.

Abstract

The PCP contamination into environment started at the beginning of 20th century and unfortunately persists nowadays because of the recalcitrant nature of this pollutant. Fungi had been a great alternative to degrade pollutants since they can remove them by physicochemical procedures, in some cases until mineralization. *Rhizopus oryzae* ENHE (CDBB-H-1877), a zygomycete isolated from PCP-contaminated soil, is a filamentous fungus that it is able to remove PCP. In this work it was showed that *R. oryzae* ENHE can remove PCP by means three mechanisms; two of which are related to the partial degradation of PCP and are metabolically dependents.

Biosorption was the main mechanism of PCP removal. The sorption of PCP on dried powdered biomass was reversible, dependent of temperature and it was increased at pH 5.0, where the maximum sorption capacity of PCP was 16.99 mg PCP g⁻¹ biomass. On the other hand, the maximum sorption capacity of PCP was 37.09 mg PCP g⁻¹ biomass at pH 3.3 using a wet weight biomass.

R. oryzae ENHE uses both methylation and dechlorination reactions as metabolic strategies to degrade PCP. However, the presence of this xenobiotic in the *R. oryzae* ENHE cultures affected its respiratory capacity, its growth, its biomass yield coefficient, its specific growth rate and its specific substrate uptake rate. It was demonstrated that PCP was mainly degraded inside of the fungus cells because of little amount of intermediates quantified in the broth. When the fungus was cultivated into a mineral medium with glucose and (NH₄)₂SO₂, as carbon and nitrogen sources, and 2 mg of PCP it was yielded 0.116 µg of pentachloroanisole, 10.46 µg chlorinated compounds and six unidentified chlorinated compounds, two of which may be 2,3,4,6-tetrachlorophenol and lactate of PCP. However, when glutamic acid and NaNO₃ were used as carbon and nitrogen sources, it was yielded 6.81 µg of pentachloroanisole, 2.89 µg chlorinated compounds and four unidentified chlorinated compounds.

R. oryzae ENHE was also cultivated in a stirring tank reactor. Preliminary results indicated that possibly some intermediates of PCP metabolism may form chlorinated dimeric and/or polymeric structures. It is necessary more investigation about that, however,

it is clear that some culture variables, such as: aeration and agitation may promote the formation of degradation products of PCP difficult to identify in culture flasks.

Capítulo 1

1 Introducción

1.1 Pentaclorofenol, usos y efectos tóxicos

El pentaclorofenol (PCF) es un hidrocarburo aromático de la familia de los clorofenoles, es soluble en disolventes orgánicos polares y presenta solubilidad limitada en agua y en disolventes no polares. Es un sólido de color café (grisáceo) cuando su pureza es limitada y es un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de entre 190-191°C, cuando su pureza es superior al 98%. En solución, el PCF se comporta como ácido débil [1].

Históricamente, el uso del PCF comenzó en los años 30's del siglo pasado. En un principio, el PCF era utilizado para la eliminación de una gran variedad de plagas (plantas indeseadas, algas, insectos, hongos, bacterias, caracoles, etc.) [2]. Sin embargo, con el paso del tiempo, los conocimientos en la síntesis orgánica incrementaron y plaguicidas más específicos para ciertas plagas y con mayor potencia surgieron al mercado, limitando el uso del PCF a tareas industriales más concretas como recubrimiento de postes de electricidad y de líneas telefónicas, durmientes, pilotes de madera, postes de cercas y madera para construcción [2, 3].

El uso desmedido del PCF durante el siglo XX causó que este xenobiótico se volviera ubicuo en el medio ambiente (aire, agua y suelo) y se mantuviera en contacto directo con el ser humano y otros organismos. Se ha estimado que la mayor proporción de PCF en el medio ambiente se encuentra en los suelos (96.5%), seguido por los mantos acuíferos (2.5%), sedimentos (1%), aire, sedimentos suspendidos y la biota (< 1%) [4]. Debido a esta distribución, la principal vía de contacto con el ser humano es a través de la cadena

Capítulo 1

alimenticia [4]. Aunque, el contacto dérmico directo y la inhalación del plaguicida han contribuido considerablemente a la intoxicación de los seres humanos [5, 6].

En el cuerpo humano, el PCF es absorbido a través del tracto gastrointestinal o por la piel. Después de la absorción, el PCF se distribuye a todos los tejidos y órganos (principalmente el hígado), y a fluidos corporales como sangre, orina, fluidos seminales y leche [6, 7].

A nivel celular, el efecto tóxico del PCF se relaciona con la disminución de la síntesis de ATP por medio del desacoplamiento de la fosforilación oxidativa [8-10]; también se ha comprobado que puede llegar a formar aductos con nucleósidos y nucleótidos en el ADN [11]. Es por esta última actividad citotóxica que el PCF es clasificado como probable carcinógeno humano (Grupo B2) por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA, acrónimo en inglés) [12, 13].

En seres humanos, el efecto tóxico del PCF es inespecífico, ya que en personas que han estado expuestas al plaguicida por tiempos prolongados se ha observado una gran variedad de enfermedades degenerativas [14]. Entre éstas destacan el cáncer de tráquea, bronquios, pulmones, hígado, riñones, linfocitos (linfoma non-Hodgkin) y tejido suave; además de alteraciones en el sistema endocrino [5, 14, 15].

Tabla 1.1 Resumen de usos legales del PCF por algunos países.

Estatus legal	País	Año	Usos permitidos	Referencia
Prohibido	Austria	1991	Sólo investigación	[16]
	India	1991	Ninguno	
	Indonesia	1980	Ninguno	
	Nueva Zelanda	1991	Ninguno	
	Suecia	1978	Ninguno	
	Suiza	1988	Ninguno	
	Alemania	1989	Sólo investigación	
Rigurosamente restringido	EU/EEA ¹	1991-2	Preservación de madera, impregnación de fibras y textiles de uso pesado, materia prima en procesos industriales y en el tratamiento de edificios culturales y de interés histórico	[16, 18]
	Belice	1985	Preservación de madera	[16]
	China ²	1997	Germicida en madera	[19]
	Estados Unidos	1984	Preservador de Madera de uso industrial	[3]

	Canadá	1981	Preservador de madera de uso industrial	[5]
Restringido	México ³	-----	Tratamiento de madera, materia para la síntesis de plaguicidas y como plaguicida	[20]

¹Miembros de la Unión Europea (EU, acrónimo en inglés): Austria, Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Irlanda, Italia, Luxemburgo, Países bajos, Portugal, España, Suecia, Reino Unido. Miembros del Acuerdo Económico Europeo (EEA, acrónimo en inglés): Islandia, Liechtenstein, Noruega.

²China prohibió completamente el uso del PCF como molusquicida hasta el año 2000.

³En México no existe una norma oficial donde se prohíba o limite el uso del PCF. Sin embargo, en el catálogo de plaguicidas publicado por la CICOPLAFEST se indican los posibles usos legales del plaguicida en territorio mexicano.

Como consecuencia del gran daño que el PCF causa a la salud humana, algunas naciones han prohibido completamente su uso, permitiendo solamente la utilización de este plaguicida con fines de investigación (tabla 1.1). Sin embargo, algunos otros países han limitado su uso sólo a la protección de maderas para fines industriales, independientemente de su uso en la investigación (tabla 1.1). Por el contrario, los países pertenecientes a la EU y EEA desarrollaron normas más flexibles con respecto a la utilización del PCF, prohibiendo su uso a la población en general pero permitiendo su uso en la preservación de maderas de uso industrial, recubrimiento de textiles de uso industrial, como materia prima y para la preservación de patrimonio cultural e histórico de las naciones (tabla 1.1).

Debido a la oportuna legislación de la gran mayoría de los países que se listan en la tabla 1.1, existe una tendencia a la disminución de la concentración del PCF en el medio ambiente a partir de su restricción de uso [18, 21]. Sin embargo, en países como China la presencia del PCF en el ambiente ha incrementado, a partir de los años 90's del siglo pasado, debido a brotes recurrentes de esquistosomiasis [21]. Fue hasta el año 2000 que China prohibió completamente el uso del PCF como molusquicida [19].

En México, el catálogo publicado por la comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST) clasifica al PCF como sustancia de uso restringido y permite su uso en actividades agrícolas, industriales y urbanas [20]. Sin embargo, y a diferencia de otros países con normas más estrictas sobre el uso de plaguicidas, en México no se tiene un control sobre el uso del PCF, no se sabe el impacto del plaguicida sobre la salud de la población mexicana y mucho menos se sabe sobre el grado de contaminación del territorio mexicano por este contaminante.

Es debido a esta clara falta de atención de las autoridades mexicanas que trabajos de remoción y degradación de PCF son importantes actualmente en nuestro territorio.

1.2 Biosorción

La biosorción, como concepto, se empezó a utilizar en el proceso de remoción de metales con biomasas microbianas (sin actividad metabólica) para disminuir su impacto tóxico. Con el tiempo, la biosorción no sólo se limitó a metales tóxicos, sino que se empezó a utilizar para remover cualquier metal (incluso metales preciosos), metaloides, elementos radiactivos, compuestos orgánicos (xenobiótico principalmente) y partículas. Actualmente, la biosorción se define como la captación pasiva de un contaminante en solución acuosa por medio de materiales de origen biológico, sin actividad metabólica. La biosorción es un proceso fisicoquímico parecido a la adsorción y al intercambio iónico, con la diferencia de que el sorbente es de origen biológico [22, 23]. La biosorción se caracteriza por utilizar sorbentes que se encuentran abundantemente en la naturaleza o son desechos industriales. Entre los biosorbentes más disponibles se encuentran las biomasas de origen algal, fúngica y bacteriana. Los materiales de desecho o subproductos de procesos fermentativos a gran escala son la fuente de la nueva familia de biosorbentes. Aunque, recientemente se ha puesto particular atención a sorbentes procedentes de desechos agroindustriales por sus bajos costos y grandes rendimientos de remoción [22].

Veglio y Beolchini [24] clasificaron los mecanismos de biosorción de acuerdo a dos criterios: el metabolismo celular y con base en la localización de sorbato en la biomasa. Esta clasificación se propuso para la biosorción de metales, sin embargo, con algunas excepciones puede aplicarse a la biosorción de xenobióticos. La biosorción en función del estado metabólico celular se clasifica como: i) dependiente del metabolismo; y ii) como no dependiente del metabolismo. Mientras que la clasificación con base en la localización del sorbato se divide en: i) acumulación extracelular/precipitación (principalmente metales); ii) sorción en la superficie celular; y iii) acumulación intracelular.

Los mecanismo de sorción de clorofenoles en biomasa microbiana han sido estudiados, Bell y Tenzos [25] mostraron que la sorción de PCF en biomasa microbiana inactiva (lodos activados aerobios y biomasa de *Rhizopus arrhizus*) se llevaba a cabo en la pared celular y en otros componentes celulares de los microorganismos. Los mismos autores [25]

estudiaron la sorción de PCF en biomasa viva de lodos activados y *R. arrhizus*, concluyendo que había una relación entre la sorción de PCF y la hidrofobicidad del sorbato de acuerdo con un modelo de partición hidrofóbica, donde se correlacionó al coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}) y la concentración de sorbato en la fase sólida. Kennedy *et al.*, [26] estudiaron la sorción de clorofenoles en biomasa viva de lodos granulares anaerobios y demostraron que la cantidad de lípidos en la células puede influir en la capacidad de sorción. Además, encontraron que el PCF fue el clorofenol más fuertemente sorbido por la biomasa en comparación al fenol, mono-, di- y tri- clorofenoles. Finalmente, concluyeron que la capacidad de sorción de la biomasa de lodos granulares anaerobios tiende a incrementar con un mayor valor del K_{ow} , el cual es un indicador de hidrofobicidad. Brandt *et al.*, [27] investigaron la biosorción de PCF en biomasa viva de *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1 y propusieron que el mecanismo de sorción se lleva a cabo por una combinación de procesos de adsorción reversibles e irreversibles en función del pH. Se asumió que la adsorción reversible fue debida a adsorción física (intercambio iónico) entre el PCF iónico y la pared celular. Mientras que la adsorción irreversible fue debida a interacciones entre el PCF no disociado y la membrana celular. La interacción hidrofóbica fue más fuerte que la adsorción física, dada la naturaleza irreversible de la adsorción y la alta capacidad de sorción. Daughney y Fein [28] estudiaron la sorción de 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF) en biomasa viva de *Bacillus subtilis* y encontraron una fuerte afinidad del 2,4,6-TCF por la pared celular de la bacteria. Además, describieron la sorción del 2,4,6-TCF con un modelo de complejación superficial, en el cual las formas negativas y positivas del triclorofenol interaccionaron en una relación 1:1 con los grupos funcionales hidroxilo de la pared celular bacteriana. Aksu y Yener [29, 30] estudiaron la biosorción de fenol, *p*- y *o*- clorofenol por biomasa seca de lodos activados y encontraron que la adsorción de los monofenoles es dependiente de la posición del cloro en la molécula del fenol. La adsorción del monoclorofenol en posición *para* fue mayor que la adsorción del monoclorofenol en posición *orto*. Lo cual indica que la posición del cloro favorece la formación de interacciones aceptor-donador entre los compuestos fenólicos y los grupos funcionales de la superficie del biosorbente. Benoit *et al.*, [31] estudiaron la capacidad de biosorción por micelio liofilizado de *Emericella nidulans* y *Penicillium miczynskii* de 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) y 4-clorofenol (4-CF), y la capacidad de sorción de biomasa viva (con actividad

metabólica) de *E. nidulans* de ambos clorofenoles. Estos autores encontraron que la adsorción de los clorofenoles fue rápida en las biomásas inactivas, se realizó en la pared celular de los hongos y fue parcialmente reversible. En las biomásas fúngicas inactivas, el 2,4-DCF se adsorbió en mayor cantidad que el 4-CF, debido a un incremento en la hidrofobicidad al aumentar el número de cloros en la molécula del fenol. Aunque, en la biosorción con biomasa viva de *E. nidulans*, la biosorción de los clorofenoles fue lenta pero mayor, en comparación con la capacidad de sorción en biomasa inactiva. La biomasa viva de *E. nidulans*, tuvo mayor capacidad de sorción de 4-CF con respecto a la capacidad de sorción del 2,4-DCF. Sin embargo, se observó que la biomasa viva degradó parcialmente al 4-CF.

1.3 Biomasa fúngica como matriz para la biosorción

Parte del éxito en un proceso de biosorción es la elección de una buena matriz para llevar a cabo la remoción de un contaminante. La gran mayoría de los biosorbentes microbianos se distribuyen entre fuentes bacterianas, algales y fúngicas. Săg [32] propuso algunas ventajas para la utilización de biomásas fúngicas en los procesos de biosorción de metales pesados, sin embargo, pueden ser válidas para cualquier sorbato:

1. La biomasa fúngica ha demostrado mayor capacidad de sorción en la biosorción de metales pesados, que los adsorbentes tradicionales, tales como: carbón activado, resinas de intercambio iónico e incluso biomasa algal.
2. Son microorganismos que genéticamente pueden ser manipulados para cambiar su morfología, lo cual podría incrementar su capacidad de biosorción.
3. Muchas especies de hongos tienen bajos requerimientos nutricionales y pueden crecer en diferentes condiciones físicas, por ejemplo: cultivos líquidos o en estado sólido.
4. La separación de la biomasa fúngica de cultivos líquidos es un proceso sencillo.
5. Las biomásas fúngicas sin actividad metabólica (muertas) pueden someterse a tratamiento físicos o químicos para modificar su estructura e incrementar su capacidad de sorción.
6. El tamaño de partícula de la biomasa puede modificarse fácilmente.

Los sitios activos de sorción, donde los sorbatos pueden retenerse, son muy diversos en las biomásas fúngicas. Algunos pueden ser retenidos en los lípidos estructurales de

membrana. Sin embargo, los principales sitios activos de sorción se localizan en la pared celular. Las paredes celulares fúngicas están típicamente constituidas por polisacáridos y glicoproteínas. El principal polisacárido estructural (50-60%) de la pared celular fúngica es el glucano, formado por residuos de glucosa [33]. Seguido por la quitina (10-20%), formada por residuos de N-acetil-D-glucosamina [33]. El quitosano es otro polisacárido que se puede llegar a encontrar, en menor cantidad que la quitina y el glucano, en la pared celular de algunos zigomicetos y ascomicetos, tales como *R. nigricans* (NCIM 880), *R. oryzae* (DSM 853), *Mucor rouxii* (DMS 1191) y *A. niger* [34, 35].

Las proteínas en la pared celular de hongos filamentosos representan entre un 20% y 30% de la masa total y las principales son las glicoproteínas [33]. Baik *et al.*, [35] identificó que los principales monosacáridos relacionados con la pared celular de *R. oryzae* (DSM 853) son fucosa, xilosa, ácido glucurónico, manosa, galactosa, glucosa y N-acetilglucosamina.

1.4 Punto de carga cero (pzc) de un sorbente

El pH donde las cargas eléctricas positivas de la superficie de un sorbente están en equilibrio con las cargas negativas se conoce como el punto de carga cero (pH_{pzc}). El valor del pH_{pzc} permite proponer hipótesis acerca de los posibles grupos funcionales que son ionizables a un determinado pH. Además de inferir las posibles interacciones de los solutos con el sorbente. Tomando como un punto de referencia el valor del pH_{pzc} en la escala de pH, a valores de pH superiores al pH_{pzc} , la superficie del sorbente presentará carga negativa. Mientras que a valores de pH inferiores al pH_{pzc} , la carga eléctrica del sorbente será preferentemente positiva. Esto quiere decir que a valores de pH superiores al pH_{pzc} , los solutos cargados positivamente interactuarán con mayor fuerza con el sorbente y a valores de pH inferiores al pH_{pzc} , los solutos cargados negativamente interactuarán preferentemente con el sorbente [36].

1.5 Isotermas de sorción

Una isoterma de sorción es una curva que describe el fenómeno de remoción o movilidad de un sorbato, en solución o en fase gas, a un sorbente a temperatura y pH constante [37]. Cuando el sorbato está en solución, se debe mantener constante la velocidad de agitación. A diferencia de una cinética, la isoterma de sorción debe construirse estrictamente en el

Capítulo 1

equilibrio de sorción. Para una interpretación cuantitativa de una isoterma es necesario utilizar modelos matemáticos que correlacionen la cantidad de sorbato retenido en el sorbente y la concentración del sorbato remanente (o en el equilibrio). Los modelos matemáticos propuestos por Langmuir, Freundlich y Redlich-Peterson son los más utilizados para caracterizar la sorción en el equilibrio. A continuación se describen sus fundamentos teóricos.

1.5.1 Isoterma de Langmuir

La isoterma de Langmuir fue diseñada para describir la sorción de gases en sólidos [38]. Teóricamente, esta isoterma indica que las moléculas del sorbato pueden formar una monocapa en la superficie del sorbente, lo cual indicaría que en el sorbente existen un número finito de sitios de unión donde las moléculas del sorbato se pueden unir. Además, las moléculas sorbidas no pueden interactuar entre sí, ni tampoco con las moléculas no sorbidas que se encuentran en la fase gas o en la fase acuosa.

La sorción explicada por la isoterma de Langmuir se refiere a una sorción homogénea, en donde las moléculas de sorbato poseen entalpías y energías de activación de sorción constantes. En otras palabras, todos los sitios de unión de sorción poseen igual afinidad por el sorbato. La isoterma de Langmuir es termodinámicamente consistente con la ley de Henry a bajas concentraciones de sorbato [37, 39].

La representación no lineal de la isoterma de Langmuir es la siguiente:

$$q_e = \frac{q_m K_a C_e}{1 + K_a C_e} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde q_m (mg g^{-1}), K_a (L mg^{-1}) y C_e (mg L^{-1}) son la capacidad máxima de sorción, la constante de equilibrio de Langmuir y la concentración del sorbato en el equilibrio, respectivamente.

1.5.2 Isoterma de Freundlich

La isoterma de Freundlich es una ecuación exponencial que describe una sorción que puede llegar a ser reversible, es no ideal y se lleva a cabo en superficies heterogéneas, donde la formación de una monocapa no está restringida. Por lo tanto, las moléculas sorbidas y las no sorbidas pueden interactuar entre sí [40, 41]. En este contexto, la cantidad de

moléculas sorbidas será la suma de la sorción en todos los sitios de unión (cada uno con diferentes energías de enlace), con los sitios de unión con mayor energía de enlace ocupados al principio hasta que la energía de sorción disminuya exponencialmente hasta completar el proceso de sorción [37].

El modelo de Freundlich no sigue la ley de Henry, por lo tanto no se reduce a una isoterma lineal a concentraciones bajas de moléculas sorbidas [39]. La isoterma de Freundlich se describe con la siguiente ecuación no lineal:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde K_F ($\text{mg g}^{-1})(\text{L mg}^{-1})^{1/n}$ es la capacidad de sorción del sorbente y $1/n$ es el índice de heterogeneidad y presenta valores entre 0 y 1. Si el valor de n es igual a la unidad, la sorción es lineal y sigue la ley de Henry. Si el valor de n está por debajo de la unidad, significa que la sorción es debida a un proceso químico. Mientras que si el valor de n presenta valores por arriba de la unidad, significa que la sorción es debida a un proceso físico [42].

1.5.3 Isoterma de Redlich-Peterson

La isoterma de Redlich-Peterson es un modelo no lineal que combina características de las isotermas de Langmuir y Freundlich, y presenta de tres constantes: A (L g^{-1}), B y g ($1 \text{ mg}^{-1})^{1/n}$ [43]. La isoterma de Redlich-Peterson se representa de la siguiente forma:

$$q_e = \frac{AC_e}{1+BC_e^g} \quad \text{Ec. 3}$$

El modelo empírico de Redlich-Peterson se reduce a una isoterma lineal a bajas concentraciones de soluto. Mientras, que a altas concentraciones su comportamiento es más cercano a la isoterma de Freundlich. Cuando el parámetro g es igual a la unidad, la sorción del soluto en el sorbente es similar al comportamiento encontrado en la isoterma de Langmuir. Por lo tanto, los valores de g siempre variaran entre 0 y 1 [44].

1.6 Cinéticas de sorción

La cinética de sorción es una representación gráfica que describe la capacidad de sorción de un sorbente con respecto al tiempo a una temperatura y pH constante. Si la fase donde el

Capítulo 1

soluta está disuelta fuese líquida, la velocidad de agitación debe ser constante. De una cinética de sorción se puede calcular la constante cinética que estima la velocidad de sorción y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. El equilibrio de sorción se establece cuando el sorbato contenido en la fase gas o líquida ha estado el tiempo suficiente en contacto con el sorbente, y la concentración del sorbato en la solución se encuentra en balance dinámico con la concentración del sorbato en la fase sólida [37]. Los modelos cinéticos de pseudo-primer y segundo orden desarrollados por Lagergren y Ho han sido los más utilizados para caracterizar la velocidad de sorción de un sorbato. A continuación se mencionan las bases teóricas detrás de los modelos cinéticos de pseudo-primer y segundo orden.

1.6.1 Ecuación de pseudo-primer orden

La ecuación de pseudo-primer orden fue desarrollada por Lagergren y fue la primera ecuación propuesta para explicar la sorción en un sistema líquido/sólido [45-47]. El modelo de Lagergren está basado en la capacidad del sólido para sorber las moléculas del sorbato y se puede expresar de la siguiente manera:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad \text{Ec. 4}$$

Donde la k_1 es la constante de velocidad de pseudo-primer orden (min^{-1}), q_e y q_t son las capacidades de sorción de soluto en el equilibrio y a cualquier tiempo (mg g^{-1}), respectivamente. Integrando y aplicando las condiciones de frontera $t = 0$ para $t = t$ y $q_t = 0$ para $q_t = q_t$, a la ecuación 4 se obtiene la ecuación 5.

$$\log\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = \frac{k_1}{2.303} t \quad \text{Ec. 5}$$

Re-escribiendo la ecuación 5 a una expresión no lineal, se obtiene la ecuación 6

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Ec. 6}$$

La ecuación desarrollada por Lagergren presenta algunas restricciones que limitan su uso. Difiere de una ecuación de verdadero primer orden debido a que el término $k_1(q_e - q_t)$ no representa el número de sitios de unión donde se puede llevar a cabo la sorción. Además, el término $\log(q_e)$, obtenido de la forma lineal de la ecuación, es un parámetro ajustable que a

menudo no es un valor igual al obtenido del gráfico $\log(q_e - q_t)$ contra t . En una ecuación de verdadero primer orden, el término $\log(q_e)$ es igual a la intersección de la gráfica $\log(q_e - q_t)$ contra t .

1.6.2 Ecuación de pseudo-segundo orden

El modelo cinético de pseudo-segundo orden fue desarrollado por Ho e inicialmente fue descrito para la sorción de cobre en turba. El modelo cinético se basa en el supuesto de que el paso limitante de velocidad de sorción es debido a sorción química, en donde se pueden compartir o intercambiar electrones entre el sorbente y el sorbato [48]. La ecuación 7 representa al modelo de pseudo-segundo orden de Ho.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2 \quad \text{Ec. 7}$$

Donde k_2 es la constante de velocidad de sorción de pseudo-segundo orden ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), q_e es la concentración del soluto sorbido en el equilibrio (mg g^{-1}) y q_t es la concentración del soluto sorbido en el sorbente a cualquier tiempo (mg g^{-1}). Al integrar la ecuación 7 con las condiciones de frontera $t = 0$ para $t = t$ y $q_t = 0$ para $q_t = q_t$, se obtiene la ecuación 8 que representa la forma lineal del modelo.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{h} + \frac{1}{q_e} t \quad \text{Ec. 8}$$

Donde h es considerada como la velocidad de sorción inicial q_t/t , cuando t se aproxima a 0. Por lo tanto, $h = k_2 q_e^2$. Sin embargo, la ecuación 8 se puede re-escribir a su forma no lineal, como se muestra en la ecuación 9.

$$q_t = \frac{k_2 t q_e^2}{1 + k_2 t q_e} \quad \text{Ec. 9}$$

El modelo cinético de pseudo-segundo orden presenta ciertas ventajas sobre el modelo de pseudo-primer orden. Por ejemplo, el modelo de pseudo-segundo orden permite la estimación de la capacidad de sorción en el equilibrio (q_e) directamente del modelo, sin necesidad de estimar este parámetro con isotermas de sorción o por ensayo o error, como es lo acostumbrado al utilizar el modelo de pseudo-primer orden. Con el modelo cinético de pseudo-segundo orden se puede calcular la velocidad inicial de sorción. Además, el modelo

permite estimar el valor de la constante de velocidad de pseudo-segundo orden sin conocer otros parámetros cinéticos previamente, como por ejemplo q_e [49].

1.7 Mecanismos de degradación de PCF con hongos

1.7.1 Degradación por basidiomicetos

Uno de los primeros hongos estudiado con la finalidad de degradar PCF fue el hongo de pudrición blanca, *Phanerochaete chrysosporium*. Mileski *et al.*, [50] mostraron que enzimas ligninolíticas son las responsables de la descloración oxidativa de PCF y la formación de tetracloro-*p*-benzoquinona (TCpBQ). Además, indicaron que en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno, *P. chrysosporium* (BKM-1767) es capaz de mineralizar PCF. La tabla 1.2 muestra el balance de masa calculado por Mileski *et al.*, [50] en la mineralización de ^{14}C -PCF (13.6 nmol).

Tabla 1.2 Balance de masa de ^{14}C -PCF en los cultivos de *P. chrysosporium* en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno reportado por Mileski *et al.*, [50]. Después del cuarto día de cultivo se colocó el ^{14}C -PCF. Balance de masa realizado al sexto día de cultivo.

Fracción	Radioactividad recuperada (%)*	
	Con limitación de nitrógeno	Sin limitación de nitrógeno
Hexano	8.9	51.1
CH ₂ Cl ₂ ácido	13.0	4.3
Fase acuosa	24.8	26.3
Biomasa	2.8	7.6
CO ₂	50.5	10.2

*La radioactividad recuperada de los cultivos con y sin limitaciones de nitrógeno fue del 70% y 67%, respectivamente.

Con el balance de masa de ^{14}C -PCF se encontró que en los cultivos de *P. chrysosporium*, en condiciones limitantes de nitrógeno (donde se expresan las enzimas ligninolíticas), el 50.5% de la radioactividad en forma de $^{14}\text{CO}_2$, el 24.8% en intermediarios solubles en agua y el 2.8% incorporada en la biomasa del basidiomiceto. En condiciones no limitantes de nitrógeno, el 10.2% de la radioactividad se encontró en forma de $^{14}\text{CO}_2$, el 26.3% en intermediarios solubles en agua y el 7.6% en la biomasa.

Lo anterior mostró que la degradación/mineralización de PCF por *P. chrysosporium* no es un proceso exclusivo llevado a cabo por enzimas ligninolíticas, sino que también otras enzimas no ligninolíticas e incluso la biomasa del basidiomiceto estaban implicadas en la degradación de PCF.

Lin y Wang [51] propusieron que la mineralización del PCF a CO_2 por *P. chrysosporium* (BKM-1767) puede llevarse a cabo por dos mecanismos metabólicos. El primer mecanismo involucra la degradación parcial del PCF y la formación de intermediarios (por ejemplo, tetracloro-p-benzoquinona) por enzimas extracelulares ligninolíticas dependientes de H_2O_2 . Los intermediarios formados son sorbidos por la biomasa y degradados hasta CO_2 por la maquinaria intracelular del basidiomiceto. Mientras que en el segundo mecanismo, no existe una degradación extracelular previa del PCF, sino que el plaguicida es directamente sorbido por la biomasa y degradado hasta CO_2 (mineralizado) por las enzimas intracelulares de *P. chrysosporium*. La figura 1.1 representa los mecanismos metabólicos propuestos por Lin y Wang [51] para la mineralización de PCF.

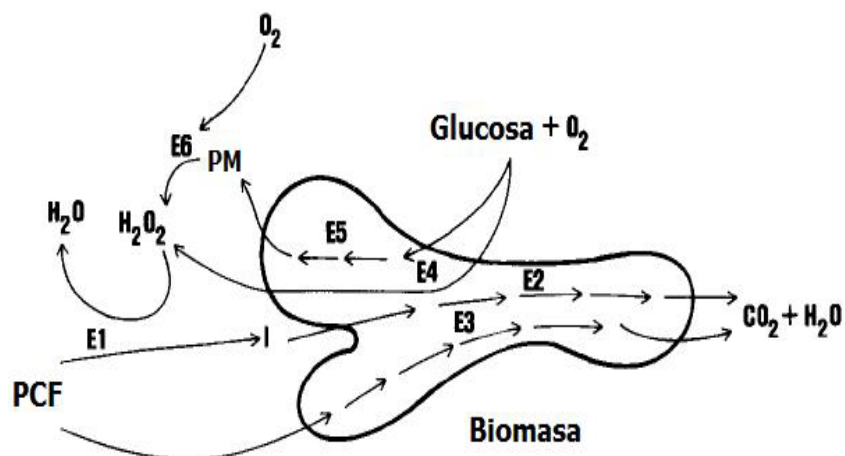


Figura 1.1 Modelo metabólico propuesto Li y Wang [51] en la degradación de PCF por *P. chrysosporium*. E1: enzimas extracelulares para la conversión de PCF a intermediarios. E2: enzimas intracelulares para la conversión de intermediarios a CO_2 . E3: Enzimas intracelulares relacionadas a la degradación directa de PCF. E4: glucosa oxidasa intracelular. E5: Enzimas relacionadas en la producción de sustratos para las enzimas E6. E6: oxidasas extracelulares para la producción de H_2O_2 . I: intermediario principal de la degradación de PCF. PM: productos metabólicos usados para la producción de H_2O_2 .

De acuerdo con los experimentos cinéticos realizador por Lin y Wang [51], los dos mecanismos actúan simultáneamente para alcanzar la mineralización del PCF.

Capítulo 1

En condiciones limitantes de nitrógeno, Reddy y Gold [52] encontraron que los principales intermediarios de la degradación de PCF por *P. chrysosporium* (OGC101) son tetracloro-1,4-dihidroxibenceno (tetraclorohidroquinona, TCHQ, III), tetracloro-*p*-benzoquinona (TC*p*BQ, II) y cantidades trazas de pentacloroanisol (PCA, IV). Para deducir la ruta de degradación de PCF, Reddy y Gold [52] colocaron los principales intermediarios de la degradación de PCF en los cultivos de *P. chrysosporium* e identificaron los productos formados. Con base en los principales intermediarios y sus posteriores productos de degradación se dedujo la ruta de degradación de PCF llevada a cabo por el metabolismo extra e intracelular de *P. chrysosporium* (figura 1.2).

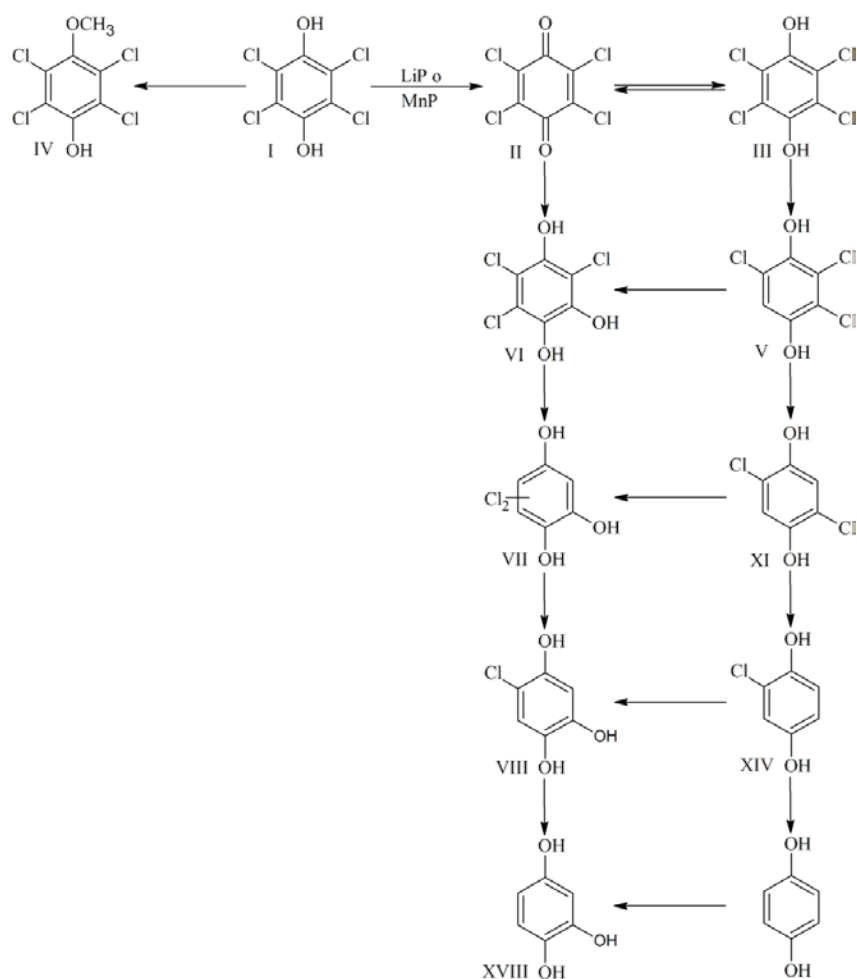


Figura 1.2 Ruta de degradación PCF por *P. chrysosporium* propuesta por Reddy y Gold [52]. Donde I: PCF; II: tetracloro-*p*-benzoquinona; III: tetracloro-1,4-dihidroxibenceno; IV: pentacloroanisol; V: 2,3,6-tricloro-1,4-dihidroxibenceno; VI: 2,3,6-tricloro-1,4,5-trihidroxibenceno; VII: diclorotrihidroxibenceno; VIII: 2-cloro-1,4,5-trihidroxibenceno; XI: 2,5-dicloro-1,4-dihidroxibenceno; XIV: 2-cloro-1,4-dihidroxibenceno; XVIII: 1,2,4-trihidroxibenceno.

El primer paso en la ruta de degradación de PCF con *P. chryso sporium* es la oxidación de PCF a tetracloro-*p*-benzoquinona (TC_pBQ, II) catalizado por lignina peroxidasa (Lip) y/o manganeso peroxidasa (MnP). La TC_pBQ (II) aparentemente es degradada por dos rutas paralelas con varios pasos de entrecruzamiento. En la primera ruta, la TC_pBQ (II) se reduce a tetraclorohidroquinona (TCHQ, III) por procesos enzimáticos o no enzimáticos. Posteriormente, la TCHQ (III) experimenta una serie de cuatro decloraciones reductivas produciendo 2,3,6-tricloro-1,4-dihidroxibenceno (V), 2,5-dicloro-1,4-dihidroxibenceno (XI), 2-cloro-1,4-dihidroxibenceno (XIV) y finalmente 1,4-dihidroxibenceno, el cual es *o*-hidroxilado a 1,2,4-trihidroxibenceno (XVIII). Alternativamente, la TC_pBQ (II) es reducida y oxidada hasta 2,3,6-tricloro-1,4,5-trihidroxibenceno (VI). Posteriormente, el 2,3,6-tricloro-1,4,5-trihidroxibenceno (VI) experimenta tres decloraciones reductivas hasta formar 1,2,4-trihidroxibenceno (XVIII). No obstante, a nivel de tricloro-, dicloro- y monoclorodihidroxibenceno, una reacción de hidroxilación puede ocurrir y re-dirigir el flujo metabólico de una ruta a la otra (figura 1.2).

Sin embargo, en condiciones no limitantes de nitrógeno, el principal producto de la degradación de PCF por *P. chryso sporium* es PCA (IV). Aunque, la transformación de TCHQ (III), 2,3,6-tricloro-1,4-dihidroxibenceno (V), diclorotrihidroxibenceno (VII) y 2,5-dicloro-1,4-dihidroxibenceno (XI) en condiciones no limitantes de nitrógeno fue similar a la observada en condiciones limitantes de nitrógeno. Además, se encontró que la TCHQ se degrada más rápidamente en condiciones no limitantes de nitrógeno, en comparación con la degradación de la hidroquinona en los cultivos limitados [52].

Reddy y Gold [53] identificaron que, en condiciones no limitantes de nitrógeno, *P. chryso sporium* declora reductivamente a la TCHQ produciendo triclorohidroquinona (2,3,5-tricloro-1,4-dihidroxibenceno). La reacción de deshalogenación se lleva a cabo en dos pasos y es catalizada por dos enzimas intracelulares; glutatión transferasa (GTS) y glutatión reductasa de conjugación (GSCR), las cuales son enzimas unidas a membranas y pertenecientes a la fracción de proteína soluble de la biomasa de *P. chryso sporium*, respectivamente. La GTS utiliza al glutatión (GSH) como co-sustrato específico, mientras que la GSCR puede utilizar como co-sustratos al ditiotreitól, GSH y cisteína. La figura 1.3 muestra la deshalogenación reductiva de TCHQ a triclorohidroquinona.

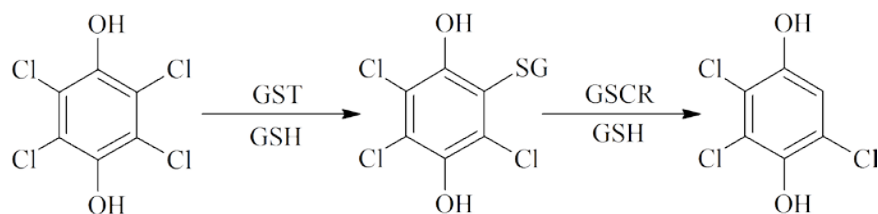


Figura 1.3 Deshalogenación reductiva de TCHQ a triclorohidroquinona vía un intermediario conjugado, GS-triclorohidroquinona propuesta por Reddy y Gold. [53]

En el primer paso de la degradación de TCHQ, en condiciones no limitantes de nitrógeno, por *P. chrysosporium*, la GTS cataliza la conjugación de las moléculas de GSH con las hidroquinonas removiendo un átomo de cloro por cada TCHQ conjugada. La reacción de conjugación forma un intermediario estable denominado GS-triclorohidroquinona, el cual sirve como sustrato para la GSCR. Esta última enzima utiliza como co-sustrato a moléculas con grupos tioles para la reducción del conjugado y formar la triclorohidroquinona.

No obstante, la deshalogenación reductiva propuesta por Reddy y Gold [53] no se limita sólo a la formación de triclorohidroquinona a partir de TCHQ. Es capaz de declorar tri- y dicloro hidroquinonas a sus correspondientes di- y monohidroquinonas vía intermediarios conjugados. Lo cual demuestra que la GST y la GSCR pueden remover átomos de cloro de anillos aromáticos de varias clorohidroquinonas.

Trametes versicolor es otro hongo de pudrición blanca capaz de degradar completamente PCF [54]. *T. versicolor* en condiciones limitantes de nitrógeno produce lacasa, una enzima ligninolítica extracelular. En reacciones *in vitro*, la lacasa oxida al PCF y forma tetracloro-*p*-benzoquinona (TC_pBQ) y tetracloro-*o*-benzoquinona (TC_oBQ) [54] (gráfico 1.4). Walter *et al.*, [55] cuantificaron, en la fase gaseosa, trazas de PCA en cultivos de *T. versicolor* en presencia de PCF.

A diferencia del metabolismo de degradación de PCF de *P. chrysosporium*, la oxidación de PCF catalizada por lacasa no es el primer paso en la ruta de degradación de PCF por el metabolismo de *T. versicolor*.

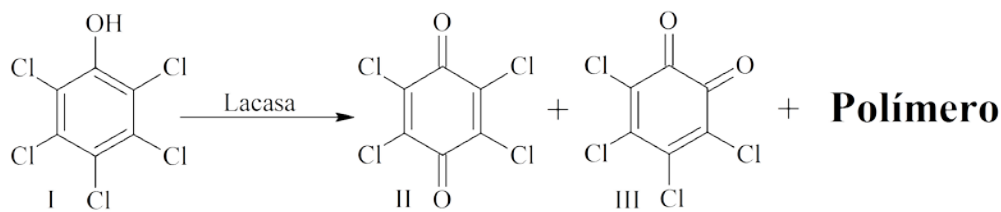


Figura 1.4 Intermediarios formados durante de la reacción enzimática de lacasa con el PCF. Donde I: pentaclorofenol; II: tetracloro-*p*-benzoquinona; III: tetracloro-*o*-benzoquinona.

A la postre, Ullah *et al.*, [56] mostraron que las tetraclorobenzoquinonas no son los únicos productos de la oxidación de PCF con lacasa (procedente de *Coriolus versicolor* FPRL-28A). Estos autores encontraron como principal producto de la reacción enzimática a un polímero clorado de alto peso molecular (alrededor de 8000 Da), el cual no perdió su estructura al someterlo a hidrólisis ácida, por lo menos durante 30 días (gráfico 1.4).

Otros hongos pertenecientes al género *Trametes* también han mostrado la capacidad para degradar PCF. Boyle [57] indicó que *T. hirsuta* (Wulf.:Fr.) pudo mineralizar PCF en condiciones limitantes y no limitantes de nitrógeno en cultivo líquido, obteniendo mejores porcentajes de formación de $^{14}\text{CO}_2$ en limitación de nitrógeno. González *et al.*, [58] mostraron que en cultivo líquido limitado en nitrógeno, *T. pubescens* (CBS 696.94) degradó PCF y otros clorofenoles. La remoción/degradación del PCF por *T. pubescens* se mejoró al suplementar el medio de cultivo con glucosa. Pese a la falta de identificación de intermediarios metabólicos, González *et al.*, [58] cuantificaron los iones cloro liberados durante la degradación de los clorofenoles. Además, observaron sorción de PCF en la biomasa.

Souza *et al.*, [59] correlacionaron la remoción de PCF, en cultivo líquido, con la actividad enzimática de lacasa producida por *Pleurotus pulmonarius* (CCB19). Este hongo en presencia de PCF y compuestos fenólicos de origen vegetal (mazorca de maíz) incrementó su actividad enzimática de lacasa. *P. pulmonarius* logró remover hasta el 70% de 25 mg PCF L⁻¹ en 96 h, con sólo un 8% del PCF sorbido por la biomasa. Resultados similares de inducción de lacasa por xenobióticos han sido reportados en cultivos de *T. versicolor* (ATCC 32745) [60].

Con lo que respecta a la degradación de PCF en un sustrato sólido, Rubilar *et al.*, [61] estudiaron la degradación de PCF con *Anthracophyllum discolor*, hongo de pudrición blanca, en cultivos de suelo lodoso enriquecido con nutrientes. Rubilar *et al.*, [61] observaron que *A. discolor* removió el 90% de 100 mg PCF kg⁻¹ de suelo en 28 días y que porcentajes similares de remoción se observaban al incrementar la concentración de PCF a 250 y 350 mg PCF kg⁻¹ de suelo. Además, caracterizaron los intermediarios formados durante la biodegradación, los cuales se muestran en la figura 1.5.

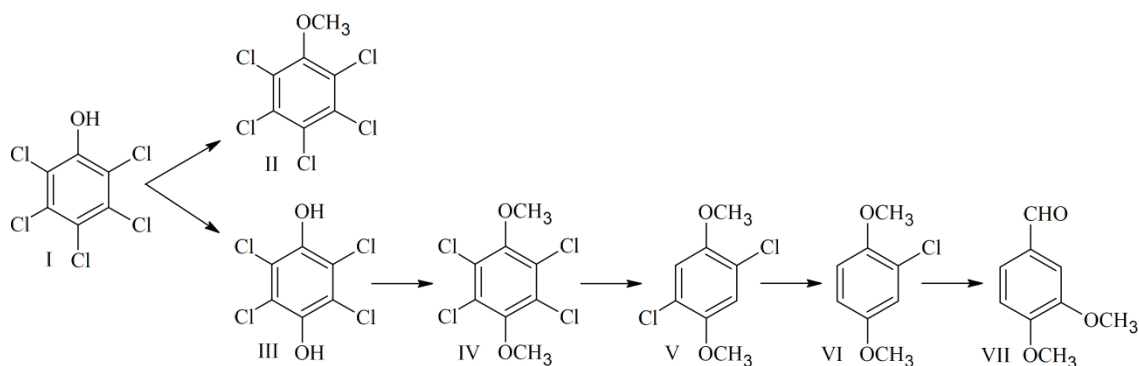


Figura 1.5 Intermediarios formados durante la degradación de PCF en los cultivos de *A. discolor* en suelo lodoso. Donde I: pentaclorofenol; II: pentacloroanisol; III: tetraclorohidroquinona; IV: tetracloro-1,4-dimetoxibenceno; V: 2,5-dicloro-1,4-dimetoxibenceno; VI: 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno; VII: 3,4-dimetoxibenzaldehído. Los compuestos I, II, V, VI y VII fueron cuantificados en los experimentos de degradación de PCF. Mientras que los compuestos III y IV fueron inferidos en base a los compuestos encontrados experimentalmente durante la degradación de PCF [61].

A. discolor disminuye la toxicidad del PCF por reacciones de metilación, formando pentacloroanisol (PCA, II). Alternativamente, hidroxila al PCF formando tetraclorohidroquinona (TCHQ, III), la cual es posteriormente metilada para generar tetracloro-1,4-dimetoxibenceno (IV). El tetracloro-1,4-dimetoxibenceno (IV) sufre una serie de decloraciones reductivas formando 2,5-dicloro-1,4-dimetoxibenceno (V) y 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno (VI), respectivamente. Los anisoles formados sufren reacciones de de-metoxilación, carboxilación, reducción y metilación hasta formar 3,4-dimetoxibenzaldehído (veratraldehído, VII), el cual puede ser degradado hasta CO₂ [61].

A pesar de que *A. discolor* mostró gran actividad extracelular de MnP durante la biodegradación, el PCF produjo un efecto negativo sobre la producción de esta enzima. De hecho, al incrementar la concentración de PCF en los cultivos, la actividad de MnP

disminuyó. Es por esto que Rubilar *et al.*, [61] concluyeron que la degradación del PCF por *A. discolor* no es del todo dependiente de los sistemas enzimáticos ligninolíticos y que posiblemente otros sistemas enzimáticos sean los responsables de la eliminación del PCF.

Se observó disminución de la actividad enzimática de MnP al estudiar la degradación de PCF en suelo Adisol (suelo de origen volcánico oscuro y muy poroso) con *A. discolor* inmovilizado en un sustrato ligninolítico, granos de trigo [62]. El sustrato ligninolítico por si solo indujo considerablemente la actividad enzimática de MnP pero al inocular el hongo inmovilizado en el suelo contaminado, la actividad enzimática disminuyó, con respecto a un cultivo control sin PCF. *A. discolor* inmovilizado en granos de trigo removió 66.6 y 82.7 mg PCF kg⁻¹ de suelo, partiendo de una concentración inicial de 250 y 350 mg PCF kg⁻¹ de suelo, respectivamente [62]. Sin embargo, al cambiar el sustrato por paja de trigo, Cea *et al.*, [63] observaron una correlación positiva entre la remoción de PCF por *A. discolor* en suelo y la actividad MnP.

No sólo los hongos de pudrición blanca han sido capaces de degradar clorofenoles, también algunos hongos de pudrición café pueden degradarlos. Fahr *et al.*, [64] reportaron que *Gloeophyllum striatum* (cepas DSM 9592 y 10335) y *Gloeophyllum trabeum* (WP 0992) mineralizaron 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) y PCF en cultivos en estado sólido crecidos en paja de trigo. Asimismo, *Gloeophyllum* mineralizó ambos clorofenoles en cultivo líquido en medio mineral definido (sin fuente de carbono, nitrógeno y fosfato) y en medio complejo limitado en nitrógeno. *G. striatum* y *G. trabeum* no producen enzimas ligninolíticas, es probable que la degradación de los clorofenoles se lleve a cabo por radicales hidroxilo formados durante el metabolismo de estos hongos.

1.7.2 Degradación de clorofenoles con hongos no basidiomicetos

La capacidad metabólica para degradar y/o mineralizar clorofenoles no es una facultad exclusiva de los basidiomicetos. Algunos hongos pertenecientes a los ascomicetos, zigomicetos, e inclusive deuteromicetos han logrado tolerar, degradar y mineralizar compuestos organoclorados. Sage *et al.*, [65] aislaron sesenta y un cepas de micromicetos de sedimentos procedentes de yacimiento de agua dulce y estudiaron la capacidad de estos microorganismos para tolerar y crecer en presencia de PCF. Estos investigadores clasificaron las cepas fúngicas con base en su capacidad para sobrevivir o no a la presencia

Capítulo 1

del tóxico, y encontraron que las cepas más tolerantes al PCF (1000 mg L⁻¹) fueron cuatro ascomicetos (*Eurotium repens*, *Pseudeurotium zonatum*, *Talaromyces trachyspermus* y *Talaromyces wortmanii*) y un deuteromiceto (*Scytalidium lignícola*). El 47 y 44% de las cepas fúngicas restantes toleró 100 y 3 mg PCF L⁻¹, respectivamente. Los pocos zigomicetos (mucorales) aislados de los sedimentos, fueron medianamente y ligeramente tolerantes al PCF.

Por su parte, Steiman *et al.*, [66] encontraron que algunos ascomicetos y levaduras podían degradar PCF (100 mg L⁻¹) en cultivo líquido, sin embargo, esta habilidad no fue directamente relacionada con la capacidad de los hongos para producir fenoloxidasas extracelulares, ya que algunos hongos fueron buenos productores de fenoloxidasas pero malos removedores de PCF y otros fueron buenos removedores pero no productores de fenoloxidasas.

Las cepas de ascomicetos con mayores porcentajes de eliminación de PCF (75-96%) fueron: *Neurospora sitophila*, *Pyronema omphalodes*, *Sporormiella minimoides*, *Emericella varicolor* var. *varicolor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Otthia spirea*, *Trichophaea abundans* y *Emericella nidulans*. En general, las levaduras no son efectivas en la degradación de PCF, con la excepción de dos cepas de *Rhodototula* que eliminaron entre el 40 y 44% del PCF.

Seigle-Murandi *et al.*, [67] al trabajar con cincuenta cepas de micromicetes (ascomicetos, zigomicetos, deuteromicetos y algunos basidiomicetos) en cultivo líquido con 1000 mg PCF L⁻¹, encontraron que los mejores degradadores de PCF fueron algunos zigomicetos (*Absidia spinosa*, *Mucor hiemalis* y *Syncephalastrum racemosum*) con 25-26% de eliminación, tomando en cuenta una pérdida abiótica del 25% del PCF inicial. Mientras que los ascomicetos y deuteromicetos no presentaron una tendencia en la degradación, variando sus porcentajes, entre el 1 y 24%.

Posteriormente, Seigle-Murandi *et al.*, [68] encontraron que la degradación de PCF (100 mg L⁻¹) por zigomicetos, no estaba estrechamente relacionada con las actividades enzimáticas de fenoloxidasas extracelulares. Estos autores también observaron que los hongos pertenecientes a los géneros *Absidia*, *Cunninghamella* y *Rhizopus* eran los que

presentaban la mayor capacidad para degradar PCF. Los hongos de los géneros *Mortierella* y *Mucor* igualmente presentaron capacidad para eliminar al tóxico, pero sus resultados fueron más heterogéneos.

1.7.2.1 Degradación por ascomicetos

van Leeuwen *et al.*, [69] estudiaron la degradación de clorofenoles con diferentes cepas de *Trichoderma harzianum* aisladas del lago Bonney (al sur-oriente del sur de Australia) contaminado con clorofenoles. Estos investigadores aislaron las cepas en diferentes puntos del lago, sin embargo, la cepa de *T. harzianum* con mayor capacidad de degradación se encontró a 10 metros del punto de descarga de los efluentes contaminados procedentes de plantas de celulosa locales.

T. harzianum degradó tetracloroguaiacol (TeCG) tanto en un medio mineral como en un medio complejo (rico en nutrientes), aunque en el medio complejo se observó principalmente la *o*-metilización del TeCG, formando tetracloroveratrol (TeCV). La *o*-metilización de TeCG ocurrió en grandes cantidades en el medio complejo (1.6 mg TeCV L⁻¹), en comparación con la observada en el medio mineral donde sólo se cuantificaron trazas. En los cultivos de *T. harzianum* en medio mineral con TeCG (2.8 mg L⁻¹) se observó una disminución del 91.6% de los compuestos halogenados orgánicos adsorbibles en 11 días, y sólo el 1.4% de estos compuestos fueron retenidos por la biomasa, mostrando que la eliminación del TeCG no fue debida a sorción.

Durante los cultivos de *T. harzianum* en medio mineral con TeCG no se identificaron intermediarios, sólo se cuantificaron los cloros liberados durante la degradación; demostrando así, la deshalogenación del TeCG.

T. harzianum en medio mineral también degradó 4,5-dicloroguaiacol, 3,4,5-tricloroguaiacol, 2,4,6-triclorofenol y PCF. Después de 20 días de cultivo, más del 95% de los guaiacoles y los clorofenoles habían desaparecido del medio de cultivo.

T. harzianum cultivado en medio mineral en presencia de PCF marcado radiactivamente (¹⁴C-PCF) lo mineralizó (2-3%); 8% de la radioactividad se encontró en la biomasa, el 43% en el medio de cultivo y 46.5% no se encontró, posiblemente porque se perdió en forma de compuestos volátiles [69]. Finalmente, se llegó a la conclusión de que posiblemente la

Capítulo 1

degradación de los clorofenoles por *T. harzianum* fue intracelular, ya que estos investigadores no cuantificaron actividades de peroxidasa extracelulares, durante los cultivos del hongo.

En cambio, Chakroun *et al.*, [70] encontraron que una lacasa producida por *Trichoderma atroviride* (CTM 10476) tiene el potencial para degradar ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 4-clorofenol (4-CF), *o*-cresol y -catecol. Estos autores purificaron y caracterizaron la enzima y la hicieron reaccionar durante 24h con los compuestos fenólicos (500 mM) en presencia y ausencia de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). En ausencia de ABTS, el *o*-catecol y el cresol fueron completamente transformados, mientras que la transformación del 2,4-D y el 4-CF fue sólo del 21 y 28%, respectivamente. Con ABTS (1.25 mM) se logró una transformación del 60 y 100% del 2,4-D y 4-CF, respectivamente.

Por su parte, Forootanfar *et al.*, [71] estudiaron la remoción de *p*-clorofenol (*p*-CF) y 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) con *Paraconiothyrium variable* en cultivo líquido. Estos autores encontraron que la remoción de los clorofenoles estaba relacionada con la actividad enzimática de lacasa, y que a mayor número de cloros en la estructura del clorofenol, fue mayor el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo. *P. variable* eliminó el 85 y 86% de 2,4-DCF y *p*-CF (40 mg L⁻¹) en 9 días, respectivamente. No obstante, la degradación de este último clorofenol se mejoró al adicionar inductores de la actividad enzimática de lacasa en el medio de cultivo. *P. variable* removió el 94%, 88% del *p*-CF al utilizar guaiacol y xilidina como inductores, respectivamente.

1.7.2.2 Degradación por zigomicetos

La remoción/degradación de clorofenoles con zigomicetos ha sido poco caracterizada, a pesar de que en la década de los 90's del siglo pasado se descubrió que algunos de estos hongos tienen la capacidad de eliminar clorofenoles. Uno de los primeros trabajos concerniente al tema fue publicado por Nakagawa *et al.*, [72] quienes caracterizaron la degradación de 2,4-diclorofenol (2,4-DCF, I) con *Mortierella sp.* (FERM p-17687) en cultivo líquido.

Mortierella sp. removió el 55% de la concentración inicial de 2,4-DCF (250 μM) después de 48 h y sólo el 13% fue retenido por la biomasa del hongo. Como intermediarios de la degradación se identificaron a la clorohidroquinona (2-cloro-1,4-dihidroxibenceno, II), 3,5-diclorocatecol (III), 3,5-dicloroguaicaol (IV) y 4,6-dicloroguaiacol (V). Los cuatro intermediarios del 2,4-DCF se detectaron principalmente en la fracción extracelular. Sin embargo, cuando se agregó al medio de cultivo clorohidroquinona, *Mortierella sp.* lo degradó a hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno,VI).

Nakagawa *et al.*, [72] concluyeron que posiblemente la degradación de 2,4-DCF por *Mortierella sp.* se lleva a cabo por dos rutas de degradación (figura 1.6). En la primera, el diclorofenol es *orto*-oxidado a 3,5-dicloroguaicaol (IV), el cual es convertido a dos diferentes dicloroguaiacoles. En la segunda, el 2,4-DCF es declorado oxidativamente formando clorohidroquinona (II), la cual es posteriormente declorada reductivamente formando hidroquinona (VI) (figura 1.6).

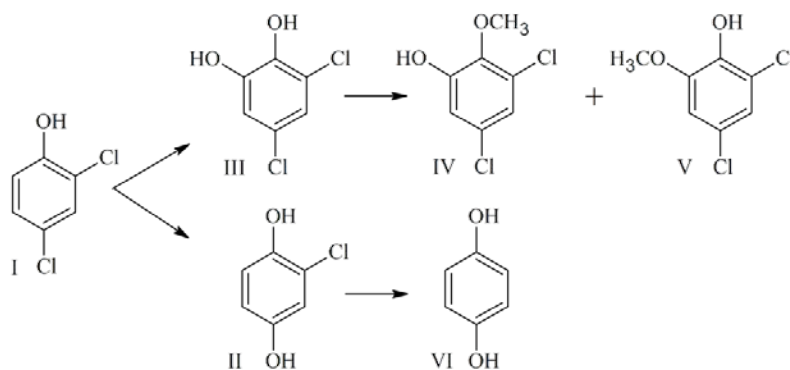


Figura 1.6 Intermediarios formados durante la degradación de 2,4-DCF con *Mortierella sp* [72]. Donde I: 2,4-diclorofenol; II: clorohidroquinona; III: 3,5-diclorocatecol; IV: 3,5-dicloroguaicaol; V: 4,6-dicloroguaiacol.

Szewczyk *et al.*, [73] encontraron que 10 hongos microscópicos aislados de desechos de fluidos de corte (cinco cepas) y de suelos contaminados con aceites tenían la capacidad para degradar PCF en cultivo líquido. Dos de las cepas aisladas de los suelos contaminados, IM 1063 e IM 6325, mostraron como principal mecanismo de degradación la *o*-metilación, ya que estos hongos formaron 3.46 y 3.2 mg PCA L⁻¹, respectivamente, después de 7 días de cultivo en medio Sabouraud en presencia de 10 mg PCF L⁻¹.

Opuestamente, la cepa IM 6203, procedente de desechos de fluidos de corte, formó como principal intermediario de la degradación a la TCHQ (1.2 mg L^{-1}), después de 7 días de cultivo en medio Sabouraud con 10 mg PCF L^{-1} . Cuando la cepa IM 6203 fue cultivada en un medio de cultivo con aceites sobre-trabajados como única fuente de carbono, el hongo formó sólo $0.43 \text{ mg TCHQ L}^{-1}$. La cepa IM 6203 fue identificada como *Mucor ramosissimus*.

Posteriormente, Szewczyk *et al.*, [74] encontraron en la degradación de PCF por *M. ramosissimus* en medio Sabouraud, concentraciones traza de 2,3,5-6-tetraclorofenol (2,3,5-6-TCF, III), 2,3,4-6-tetraclorofenol (2,3,4-6-TCF, VIII), pentacloroanisol (PCA, VI) y pentacloroetoxibenceno (PCEB, VII) después de siete días de incubación. La transformación del PCF a TCHQ por el hongo fue adjudicada a un sistema enzimático inducible asociado con el citocromo P-450.

Cuando se cultivó al hongo en presencia de pentaclorobenceno (PCB, V), TCHQ (II) y 2,3,5-6-TCF (III) en medio Sabouraud, se formaron PCF (I), 2,3,5-6-TCF (III) y 2,3,5-6-tetraclorometoxibenceno (tetracloroanisole, 2,3,5-6-TCMB, IV) como intermediarios de la degradación, respectivamente.

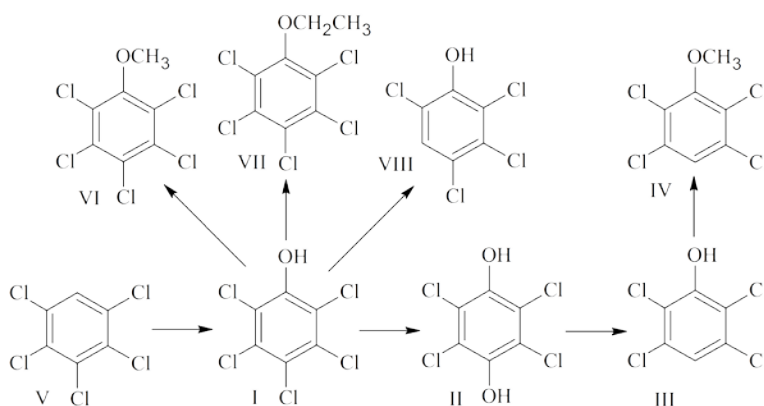


Figura 1.7 Esquema de reacción en la degradación de PCF por *M. ramosissimus* IM 6203 [74]. Donde I: pentaclorofenol; II: tetraclorohidroquinona; III: 2,3,5,6-tetraclorofenol; IV: 2,3,5,6-tetraclorometoxibenceno; V: pentaclorobenceno; VI: pentacloroanisol; VII: pentacloroetoxibenceno; VIII: 2,3,4,6-tetraclorofenol.

De acuerdo a los resultados reportados por Szewczyk *et al.*, [74], *M. ramosissimus* puede degradar PCF por dos vías. En la primera, existe una inserción de grupos hidroxilo en el

anillo aromático con una simultánea remoción de iones cloro (descloración oxidativa), mientras que en la segunda los grupos hidroxilo de los clorofenoles son metilados formando anisoles (figura 1.7).

No obstante, la degradación de PCF (10 mg L^{-1}) por *M. ramosissimus* mejoró en un medio mineral. Con glucosa, como fuente de carbono, el hongo formó hasta $0.76 \text{ mg TCHQ L}^{-1}$. Mientras que con aceite de motor gastado como única fuente de carbono (5%), el hongo formó $0.89 \text{ mg TCHQ L}^{-1}$ y consumió el 55% de la fuente de carbono.

Carvalho *et al.*, [75] encontraron que *Mucor plumbeus* Bonord (DMS 16513) crece, tolera y degrada PCF en condiciones co-metabólicas y metabólicas; es decir, utilizando a la glucosa y al PCF como fuentes de carbono. En co-metabolismo ($10 \text{ g glucosa L}^{-1}$), el hongo removió el 100% de 5 y 10 mg PCF L^{-1} en un periodo de entre 40 y 60 días. Sin embargo, el hongo removió el 100% de 1 y $2.5 \text{ mg PCF L}^{-1}$, y el 85% de 5 mg PCF L^{-1} entre 50 y 60 días utilizado al tóxico como única fuente de carbono.

Posteriormente, Carvalho *et al.*, [76] identificaron los intermediarios de la degradación de PCF formados durante los cultivos de *M. plumbeus*. Estos intermediarios fueron principalmente moléculas conjugadas producto de un metabolismo de degradación en fase II (glucosa-PCF, glucosa-TCHQ, ribosa-TCHQ, sulfato-TCHQ, glucosa-TrCHQ); aunque también se identificaron moléculas di-conjugadas (sulfato-glucosa-PCF y sulfato-glucosa-TCHQ) y clorofenoles libres, tales como: tetraclorohidroquinona (TCHQ) y 2,3,6-triclorohidroquinona (2,3,6-TrCHQ). Sin embargo, Carvalho *et al.*, [76] no correlacionaron la degradación del PCF con la actividad de enzimas extracelulares ni tampoco con la del citocromo P-450.

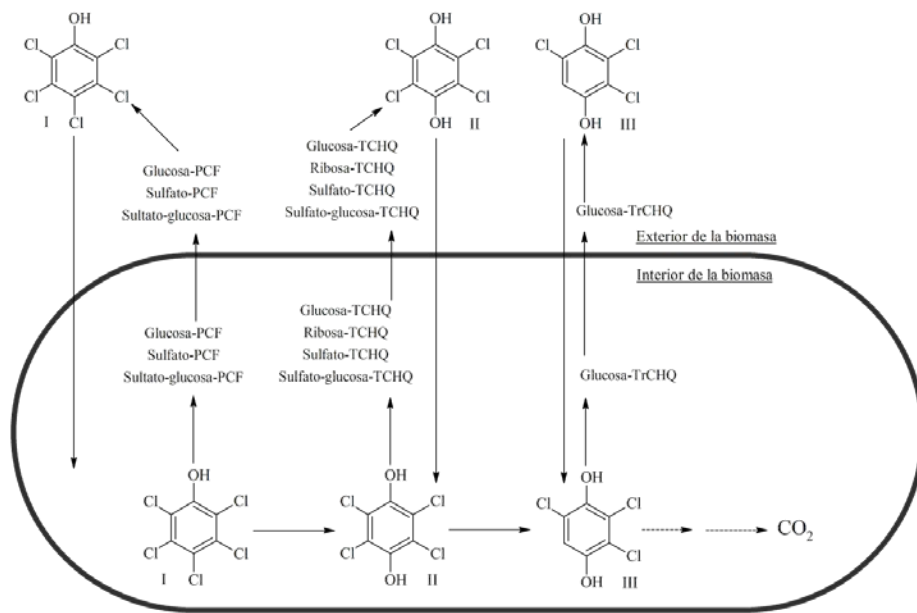


Figura 1.8 Visión esquemática de la degradación de PCF por *M. plumbeus* [76]. Donde I: pentaclorofenol; II: tetraclorohidroquinona; III: 2,3,6-triclorohidroquinona.

Antes de iniciar la degradación del PCF por *M. plumbeus*, el tóxico debe de ser transportado al interior de la biomasa donde es dechlorado oxidativamente a TCHQ, la cual es subsecuentemente dechlorada reductivamente a 2,3,6-TrCHQ. Tanto el PCF como sus intermediarios son intracelularmente conjugados y transportados al exterior de la biomasa donde pueden ser de-conjugados (figura 1.8).

Capítulo 2

2 Antecedentes, justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Antecedentes

El género *Rhizopus* incluye especies que a menudo se utilizan para la producción de alimentos fermentados en Asia oriental y suroriental. La clasificación del género se realiza con base en su temperatura óptima de crecimiento, al tamaño del esporangio, las esporangiosporas y a la ramificación del rhizoide. Todas las especies del género se dividen en tres grupos, los cuales son: *stolonifer*, *oryzae*, y *microsporus* [77]. El género *Rhizopus* consiste en 13 especies. Abe *et al.*, [78] reportaron que las cepas de *R. oryzae* se dividieron en 2 tipos; cepas productoras de ácido láctico, y cepas productoras de ácido fumárico-málico. Las cepas de *R. oryzae* que producen ácido láctico presentan dos genes para la expresión de lactato deshidrogenasa; *ldhA* y *ldhB* [79]. Mientras que las cepas productoras de ácido fumárico-málico carecen del gene *ldhA*, el cual es el responsable de la producción de ácido láctico.

Las cepas de *Rhizopus oryzae* tradicionalmente se ha utilizado para la producción de moléculas orgánicas, tales como: ácidos orgánicos, etanol y glicerol [78, 80]. Aunque también se ha utilizado para la producción de macromoléculas de alto valor comercial, tales como: proteasas y lipasas [81, 82]. La versatilidad metabólica de *R. oryzae* ha demostrado que en condiciones de fermentación sólida puede sintetizar compuestos orgánicos volátiles, tales como: etanol, acetaldehído, acetato de etilo, propionato de etilo, 3-metilbutanol y 1-propanol [83].

Capítulo 2

Sin embargo, pocos son los trabajos que se han enfocado en utilizar a *R. oryzae* en la eliminación de compuestos tóxicos. Nagarathnamma y Bajpai [84] llevaron a cabo la decoloración y detoxificación de un efluente de la primera etapa de extracción alcalina durante el proceso de blanqueado de la pulpa del eucalipto. En este estudio, la biomasa de *R. oryzae* en condiciones co-metabólicas (1g glucosa L⁻¹) removió y/o degradó el 92%, 50%, 72% y 37% del color, demanda química de oxígeno, haluros orgánicos absorbibles, haluros orgánicos extraíbles en 24 h, respectivamente. Resultados similares de remoción de materia orgánica, se observaron con biomasa de *R. oryzae* inmovilizada en espuma de poliuretano; pero con la ventaja de la reutilización de ésta en varios ciclos de remoción [84].

Asimismo, Freitas *et al.*, [85] usaron a *R. oryzae* para la degradación de materia orgánica pero en un efluente del procesos del blanqueado de la pulpa de *E. globulus* después de un tratamiento secundario (en una planta de celulosa que no lleva a cabo el blanqueado de la pulpa con cloro elemental). *R. oryzae* cultivado en un biorreactor en co-metabolismo (1 g glucosa L⁻¹), después del primer día de tratamiento, logró remover el 25% y 41% de la relación absorbancias relativas del efluente (250 nm y 465 nm, respectivamente). Después de 10 días, *R. oryzae* removió entre el 81% y 82% de la materia orgánica. Además encontraron actividad de las enzimas extracelulares lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), las cuales fueron relacionadas con la degradación de los compuestos orgánicos. Sin embargo, no caracterizaron los compuestos orgánicos presentes en el efluente.

Rocha-Santos *et al.*, [86], por su parte, caracterizaron los compuestos orgánicos presentes en un efluente similar al reportado por Freitas *et al.*, [85] e identificaron en el efluente 24 ácidos carboxílicos, 5 alcoholes grasos, 6 compuestos fenólicos y 2 esteroides. Bajo las condiciones con-metabólicas (1g glucosa L⁻¹) de cultivo descritas por Rocha-Santos *et al.*, [86], *R. oryzae* removió, en 10 días, todos los ácidos grasos, ácidos tricarbóxicos, ácidos fenólicos, alcoholes grasos y esteroides, así como entre el 93% y 99% de los hidroxiacidos monocarbóxicos y entre el 91% y 100% de los hidroxiacidos dicarbóxicos, y un 90% de los ácidos monocarbóxicos. En términos generales, *R. oryzae* removió el 99% de los compuestos orgánicos y disminuyó la absorbancia de los compuestos orgánicos que

absorben luz de efluente al 47% y 74% (270 nm y 465 nm, respectivamente). Sin embargo, *R. oryzae* no fue capaz de degradar completamente los compuestos derivados de la lignina, los cuales absorben luz principalmente a 270 nm.

Pese a que se ha visto que *R. oryzae* es capaz de degradar compuestos orgánicos de efluentes contaminados, no ha sido aclarado su papel en la eliminación de compuestos aromáticos clorados. León-Santiesteban *et al.*, [87] aislaron un zigomiceto de un suelo contaminado con PCF (Puebla, Puebla, México) y lo identificaron molecularmente como *R. oryzae*, y debido a que tenía un 100% de identidad en 604 nucleótidos en la secuencia 18S-rDNA con la cepa reportada en el centro nacional de investigación biotecnológica (NCBI, acrónimo en inglés) se le nombró cepa ENHE. Esta cepa toleró 100 mg PCF L⁻¹ en cultivos en placas de agar, y logró remover el 90% de 12.5 mg PCF L⁻¹ en 24 h. Se reportó por primera vez la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares por un zigomiceto; se cuantificó LiP en el medio de cultivo durante la remoción de PCF. Posteriormente, Freitas *et al.*, [85] reportaron la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares por una cepa de *R. oryzae*. Cea *et al.*, [63] observaron que durante la degradación de PCF en suelos de origen volcánico con *A. discolor* inmovilizado en paja de trigo, algunos microorganismo autóctonos del suelo podían llevar acabo eficientemente la degradación de PCF. Mediante un análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, acrónimo en inglés), Cea *et al.*, [63] encontraron un gran diversidad de bacterias y hongos procedentes del suelo volcánico posiblemente relacionados con la degradación de PCF. Sin embargo, *R. oryzae* fue el hongo más predominante.

León-Santiesteban *et al.*, [88] inmovilizaron a *R. oryzae* ENHE en fibra de nylon y observaron que la capacidad de remoción de PCF por el zigomiceto incrementó considerablemente, *R. oryzae* ENHE removió el 88.6% y 92% de 12.5 y 25 mg PCF L⁻¹ en 48 h y 72 h, respectivamente.

Recientemente, *R. oryzae* cepa ENHE fue resguardada en la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del I.P.N (CINVESTAV) bajo el acrónimo CDBB-H-1877.

2.2 Justificación

Los estudios realizados han demostrado que *R. oryzae* tiene la capacidad de remover de una fase líquida una gran variedad de compuestos orgánicos; inclusive plaguicidas como el PCF. Sin embargo, no ha sido comprobado si el PCF removido del medio de cultivo por el hongo sufre transformaciones químicas por su metabolismo o es simplemente retenido por la biomasa. Es por lo anterior que la comprensión de las estrategias metabólicas de remoción de PCF por *R. oryzae* ENHE contribuirá a entender cómo es que el zigomiceto remueve del medio de cultivo y/o parcialmente degrada al PCF.

2.3 Hipótesis

La biomasa de *R. oryzae* ENHE producida en cultivo líquido con un medio mineral, removerá al PCF de la fase acuosa y tendrá la capacidad metabólica de degradar parte del PCF removido. La capacidad de degradación del hongo dependerá de las fuentes de carbono y nitrógeno presentes en el medio de cultivo.

2.4 Objetivo general

Estudiar los mecanismos de *R. oryzae* ENHE para remover al PCF del medio de cultivo y comprobar si el plaguicida es degradado por el metabolismo del hongo.

2.4.1 Objetivos particulares

- Caracterizar la sorción de PCF en biomasa seca y húmeda de *R. oryzae* ENHE
- Estudiar la respuesta metabólica de *R. oryzae* ENHE a la toxicidad del PCF
- Identificar y cuantificar los productos de degradación de PCF por *R. oryzae* ENHE
- Identificar las estrategias metabólicas que *R. oryzae* ENHE utiliza para degradar al PCF

Capítulo 3

3 Sorción de PCF en biomasa de *R. oryzae* ENHE

Parte de los resultados mostrados en este capítulo fueron publicados en *Water, Air & Soil Pollution* (2014) 225 (5): 1-10

3.1 Metodología experimental

El diagrama de flujo de la figura 3.1 indica los experimentos realizados para caracterizar la sorción de PCF en la biomasa inactiva de *R. oryzae* ENHE. Los experimentos de sorción se realizaron en función del pH y se dividieron en dos bloques. En el primer bloque de experimentos se investigó la sorción de PCF en biomasa seca. Mientras que en el segundo bloque se caracterizó la sorción de PCF en biomasa húmeda. A la biomasa seca se le determinó su punto de cero carga (*pzc*) y los grupos funcionales presentes en ella, así como su capacidad de sorción con respecto al tiempo, en el equilibrio y en función de la temperatura. A la biomasa húmeda se le determinó su capacidad máxima de sorción de PCF.

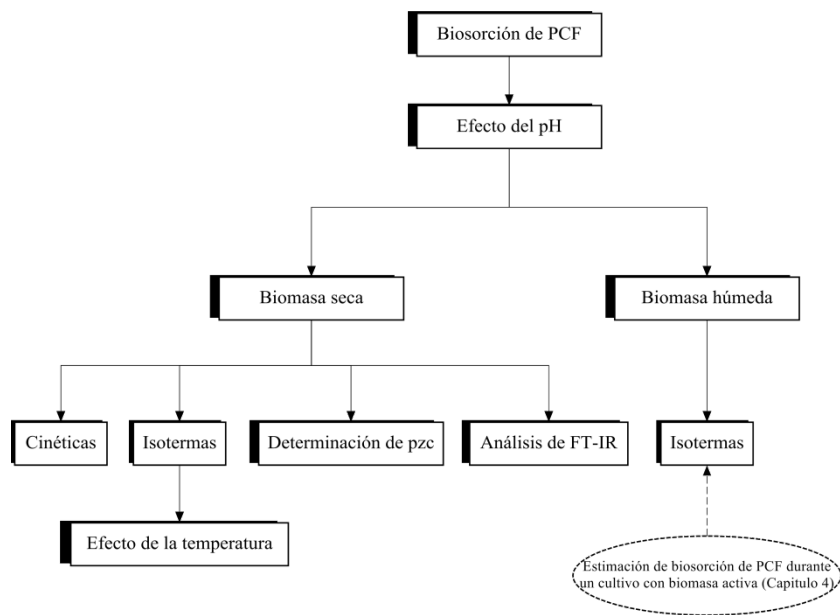


Figura 3.1 Diagrama de flujo donde se muestran los experimentos de sorción de PCF realizados con biomasa sin actividad metabólica de *R. oryzae* ENHE.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Obtención de esporas de *R. oryzae* ENHE

La esporulación de *R. oryzae* ENHE se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 40 mL de agar papa y dextrosa (PDA, 39g L⁻¹). El medio de cultivo sólido fue inoculado con una suspensión de esporas, las cuales fueron distribuidas homogéneamente en toda la superficie del agar. Para la producción de las esporas asexuales, los cultivos se mantuvieron en incubación a 30°C durante una semana.

3.2.2 Concentración, lavado y conteo de esporas de *R. oryzae* ENHE

Las esporas se concentraron en una solución de tween 80 al 0.1% (v/v) por medio de agitación mecánica. La solución de esporas obtenida se filtró al vacío con una malla Nylal y las esporas recuperadas se lavaron utilizando la siguiente metodología:

1. La solución concentrada de esporas se centrifugó a 12,000 \times g durante 10 min a 4°C, y se eliminó el 70 % del sobrenadante.
2. Inmediatamente después, se repuso el volumen de sobrenadante con H₂Od estéril y se re-suspendieron las esporas por medio de agitación con un Vórtex.

3. El proceso de centrifugación anterior se realizó dos veces más. Sin embargo, el tiempo de centrifugación disminuyó a 5 min.
4. En el tercer y último periodo de centrifugación se eliminó el 50% del sobrenadante y se concentró la suspensión disminuyendo su volumen a la mitad.
5. Finalmente, se contó el número de esporas en una cámara de Neubauer y se calculó la concentración de esporas en la solución.

3.2.3 Medio Merlin-Norkran enriquecido

Originalmente, la glucosa es la única fuente de carbono en el medio Merlin-Norkran [88]. Sin embargo, para aumentar la producción de biomasa de *R. oryzae* ENHE se utilizó sacarosa como fuente de carbono en lugar de glucosa; a este medio de cultivo modificado se le llamó “enriquecido” y su composición por litro fue: Sacarosa, 10 g; extracto de malta, 2 g; extracto de levadura, 1 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g; y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.5 g. Las sales fueron disueltas en 500 mL de H_2O y 500 mL de amortiguador de citratos pH 5.3 (relación 50:50).

3.2.4 Producción de biomasa de *R. oryzae* ENHE

La biomasa de *R. oryzae* ENHE utilizada para los experimentos de sorción se produjo en un reactor de columna de burbujas con un volumen nominal de 1.1 L (40 cm de altura y 6 cm de diámetro). En el reactor se colocaron 600 mL de medio Merlin-Norkran enriquecido y se inoculó con 1×10^6 esporas mL^{-1} . El biorreactor se mantuvo a una temperatura constante de 30°C y se alimentó con un flujo de aire a 740 mL min^{-1} durante 24 h. La biomasa de *R. oryzae* ENHE producida en el biorreactor se separó del medio de cultivo por filtración al vacío.

3.2.5 Inactivación de la biomasa de *R. oryzae* ENHE

La biomasa de *R. oryzae* ENHE se lavó 10 veces con H_2O desionizada para eliminar el exceso de sales. En los experimentos de sorción de PCF en biomasa seca, el micelio del hongo se secó durante 5 días a 30°C y 2 días a 60°C . La biomasa seca se pulverizó en un mortero y se pasó a través de un tamiz del No. 50 (0.297 mm) para homogenizar el tamaño de las partículas. Las partículas de biomasa se secaron una vez más a 60°C durante 2 días. Finalmente, la biomasa pulverizada se llevó a temperatura constante antes de ser utilizada en los experimentos de biosorción.

En los experimentos de sorción de PCF con biomasa húmeda, el micelio de *R. oryzae* ENHE se re-suspendió en H₂O y se desactivó metabólicamente a 121°C durante 1 h. La biomasa húmeda desactivada se almacenó a 4°C hasta su uso. Para homogeneizar el contenido inicial de humedad de la biomasa, el micelio se prensó mecánicamente con papel filtro hasta que micelio dejó de liberar agua.

3.2.6 Determinación del punto de carga cero (pH_{pzc})

Para la determinación del pH_{pzc} de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se utilizó el método de titulación de masa potenciométrica (PMT, acrónimo en inglés) descrito por Bourikas *et al.*, [89] y Fiol y Villescusa [36]. Esta técnica consiste en poner en contacto tres diferentes masas de sorbente con una solución de KNO₃ y titularlas con una solución de HNO₃. La titulación consiste en agregar ciertos volúmenes de HNO₃ a las suspensiones y medir el pH que se obtiene después de la adición del ácido. Para obtener el valor del pH_{pzc} se debe hacer una gráfica de las lecturas del pH medido en las suspensiones contra los volúmenes de HNO₃ que se agregaron a las suspensiones. De las curvas de titulación resultantes, el punto donde las tres curvas se toquen, punto de intersección, será el valor de pH_{pzc} del sorbente. Para una mayor precisión del método se realizó una curva de titulación control, sin biomasa, que también debe de cruzar por el punto de intersección de las tres curvas de titulación con biomasa.

Para determinar el pH_{pzc} de la biomasa de *R. oryzae* ENHE por el método de PMT se pesaron 5.4, 8.2 y 10.2 mg de biomasa seca del hongo. Cada masa se puso en contacto con 100 mL de una solución de KNO₃ 0.03 M, que previamente había sido burbujeada con N₂ durante 30 min. Como control se utilizaron 100 mL de la solución de KNO₃ 0.03 M pero sin biomasa. Las suspensiones y el control se mantuvieron en agitación vigorosa por 24 h a temperatura ambiente. Después de 24 h, el pH de las soluciones permaneció constante y a partir de este punto se comenzó con la titulación.

La primera curva de titulación que se realizó fue la del tratamiento control. Antes de agregar la solución de HNO₃ 0.1M al control se agregó un determinado volumen de una solución de KOH (0.1 y 1 M) a la solución de KNO₃ 0.03M para alcanzar un pH inicial de 11.0. Después de que se llegó al pH inicial, se agregó poco a poco la solución de HNO₃ 0.1M, anotando el volumen gastado y el pH en cada caso, hasta alcanzar un pH final de 3.0.

El volumen de las soluciones de KOH (0.1 y 1 M) que se agregaron antes de iniciar la titulación en el tratamiento control fue exactamente el mismo volumen de las soluciones de KOH que se agregó a las suspensiones de biomasa antes de iniciar la titulación. Posteriormente, las titulaciones de las biomazas secas de *R. oryzae* ENHE se llevaron a cabo siguiendo la metodología antes descrita.

3.2.7 Experimentos de biosorción de PCF

Los estudios de biosorción de PCF se realizaron en un sistema en lote con biomasa seca y húmeda de *R. oryzae* ENHE. En la sorción de PCF con biomasa seca, los experimentos cinéticos y de isotermas se realizaron en función del pH, utilizando H₂O como fase acuosa. Los valores de pH utilizados para la sorción de PCF con biomasa seca fueron: 5.0, 6.0 y 8.0. El pH se ajustó con NaOH 0.1M y HCl 0.1N, cuando fue requerido.

En la sorción de PCF con biomasa húmeda, los estudios se realizaron en soluciones amortiguadoras de citratos 0.1 M (pH 3.3) y fosfatos 0.1 M (pH 7.5).

El PCF utilizado en este estudio fue grado industrial (pureza del 95%). Se preparó una solución concentrada de 500 mg PCF L⁻¹ (disuelta en metanol) y se hicieron las diluciones necesarias para llegar a las concentraciones de PCF requeridas en los experimentos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en la sorción de PCF con biomasa seca y por duplicado en la biosorción con biomasa húmeda. Además, se realizaron experimentos control, sin biomasa fúngica, para estudiar la pérdida abiótica del PCF durante la incubación.

La cantidad de PCF sorbido por las biomazas (q_x , mg PCF g⁻¹ biomasa) se calculó utilizando la ecuación 10.

$$q_x = \frac{(C_0 - C_x)V}{m} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde C_0 es la concentración de PCF inicial (mg L⁻¹) en la fase acuosa, C_x es la concentración de PCF cuantificada en la fase acuosa a un determinado tiempo o en el equilibrio (mg L⁻¹), V es el volumen de la solución de PCF (L) y m es la masa de la biomasa de *R. oryzae* ENHE (g).

Capítulo 3

3.2.7.1 Experimentos cinéticos de biosorción

Los estudios cinéticos de biosorción se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de una solución de 10 mg PCF L⁻¹ y 100 mg de biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. Los matraces se mantuvieron a 30°C durante 48 h a una velocidad de agitación constante de 150 rpm. De la fase acuosa, se tomaron muestras a los tiempos: 1, 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 min para la determinación del PCF no sorbido. El PCF cuantificado en la fase acuosa se utilizó para calcular las capacidades de sorción con respecto al tiempo (q_t , mg g⁻¹).

Las q_t obtenidas experimentalmente se graficaron con respecto al tiempo (min) para obtener los perfiles cinéticos de sorción de PCF en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. Los resultados experimentales se ajustaron a modelos cinéticos de sorción teóricos para obtener los parámetros cinéticos correspondientes al fenómeno de sorción. Los modelos cinéticos de sorción que se utilizaron fueron el de pseudo-primer y pseudo-segundo orden descritos por Lagergren [45] y Ho and McKay [47], respectivamente.

3.2.7.2 Experimentos de isotermas de sorción

Las isotermas de sorción de PCF con biomasa de *R. oryzae* ENHE se realizaron en un volumen 30 mL de fase acuosa en matraces Erlenmeyer de 150 mL. En la sorción con biomasa seca, 10 mg PCF L⁻¹ se mantuvieron en contacto con diferentes masas de biomasa seca de *R. oryzae* ENHE, las cuales variaron de entre 5 mg y 120 mg. En cambio, en la sorción de PCF con biomasa húmeda, 50 mg de biomasa se pusieron en contacto con siete concentraciones de PCF, las cuales fueron: 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg L⁻¹. Los matraces con biomasa y PCF se mantuvieron en agitación a 150 rpm a 30 ± 1°C por 8 h y 24 h en la sorción con biomasa seca y húmeda, respectivamente. Después de alcanzado el equilibrio de sorción, se tomaron muestras del sobrenadante para determinar la concentración de PCF en la fase acuosa. El PCF cuantificado en la fase acuosa, por HPLC, se consideró como el PCF en el equilibrio (C_e , mg L⁻¹), el cual se usó para calcular las capacidades de sorción de PCF en el equilibrio (q_e , mg g⁻¹).

3.2.8 Efecto de la Temperatura en la biosorción de PCF

Para estudiar el efecto de la temperatura en la biosorción de PCF, se realizaron isotermas sorción a pH 5.0 en matraces Erlenmeyer de 150 mL con 30 mL de una solución de 10 mg

PCF L⁻¹ y diferentes masas de biomasa secas de *R. oryzae* ENHE. Las temperaturas utilizadas en los experimentos de sorción fueron 293.15, 298.25, 303.15, 308.15 y 313.15 K. Después de que se alcanzó el equilibrio de sorción, 8 h de contacto, se tomaron muestras de la fase acuosa para cuantificar el PCF no sorbido.

3.2.9 Evaluación de los resultados experimentales con los modelos teóricos

Para ponderar el ajuste de los resultados experimentales con los modelos cinéticos y de isotermas se utilizaron el coeficiente de determinación no lineal (R²) y la prueba de Chi cuadrada (χ^2) [90].

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Cuantificación de PCF

Para cuantificar el PCF no sorbido por la biomasa de *R. oryzae* ENHE se tomaron muestras de 1.5 mL de la fase acuosa, las cuales se centrifugaron a 12,000 \times g durante 30 min; el sobrenadante resultante se filtró con membranas de nitrocelulosa de 0.22 μ m de tamaño de poro. El PCF presente en las muestras se cuantificó en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de arreglo de diodos, marca Waters. La detección del PCF se realizó por UV a 303 nm. El PCF en las muestras se separó en una columna analítica μ BondapakTM C-18 fase reversa utilizando una elución isocrática con una velocidad de flujo de 1.3 mL min⁻¹. Las fases móviles para la separación del PCF fueron (A) una solución de ácido acético al 1% en agua y (B) una solución de acetronitrilo al 1% con ácido acético (25:75, v/v). El PCF de las muestras fue cuantificado utilizando calibración externa (anexo A), y los datos cromatográficos obtenidos durante la separación fueron analizados con el software Millennium de Waters.

3.3.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros infrarrojos de las muestras sólidas de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se obtuvieron con un espectrofotómetro FT-IR GX (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) acoplado a un atenuador de señal ATR *DuranSample II*. Los espectros obtenidos fueron un promedio de 16 escaneos de 4000 a 650 cm⁻¹ a una resolución de 2 cm⁻¹.

3.4 Resultados

3.4.1 Estudios de cambios de pH

En la sorción de PCF por biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se trabajó con tres diferentes valores de pH: 5.0, 6.0, y 8.0. Después de ajustar el pH, se agregó el PCF necesario para llegar a una concentración final de 10 mg L⁻¹. Al adicionar el PCF, el pH de las soluciones cambió después de pocos minutos de agitación (tabla 3.1). De igual manera, cuando la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se agregó a las soluciones, el pH de la fase acuosa cambió de nuevo. Con la biomasa seca, se observó un incremento del pH, el cual fue independiente de la cantidad de biomasa colocada; el pH incrementó 0.9 y 0.3 unidades en los experimentos a pH iniciales de 5.0 y 6.0. Mientras que en los experimentos de sorción a pH inicial de 8.0, el pH de la fase acuosa disminuyó 0.2 unidades. Al final del proceso de biosorción, el pH medido en el equilibrio fue de 6.2, 6.0 y 6.5 para los experimentos a pH iniciales de 5.0, 6.0 y 8.0, respectivamente (tabla 3.1).

Tabla 3.1 Cambios de pH durante el proceso de sorción de PCF por la biomasa inactiva de *R. oryzae* ENHE

	pH		
Agua [°]	5.0	6.0	8.0
Solución de PCF*	5.5	6.1	6.9
Solución de PCF + Biomasa [†]	6.4	6.4	6.7
Solución de PCF + Biomasa después de 8h [°]	6.2	6.0	6.5

[°] pH ajustado inicialmente antes de agregar el PCF

* Soluciones con una concentración final de 10 mg PCF L⁻¹

[†] Lectura de pH medida después de agregar la biomasa

[°] pH en el equilibrio de sorción

3.4.2 Determinación del *pzc* de la biomasa de *R. oryzae* ENHE

El gráfico 3.1 muestra las curvas de titulación de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE obtenidas por el método de titulación de masa potenciométrica (PMT). El pH_{*pzc*} es claramente identificado como el pH donde el blanco y las curvas de titulación de biomasa seca convergen en un mismo punto. La biomasa seca de *R. oryzae* ENHE presentó un *pzc* a un pH promedio de 6.43 ± 0.3.

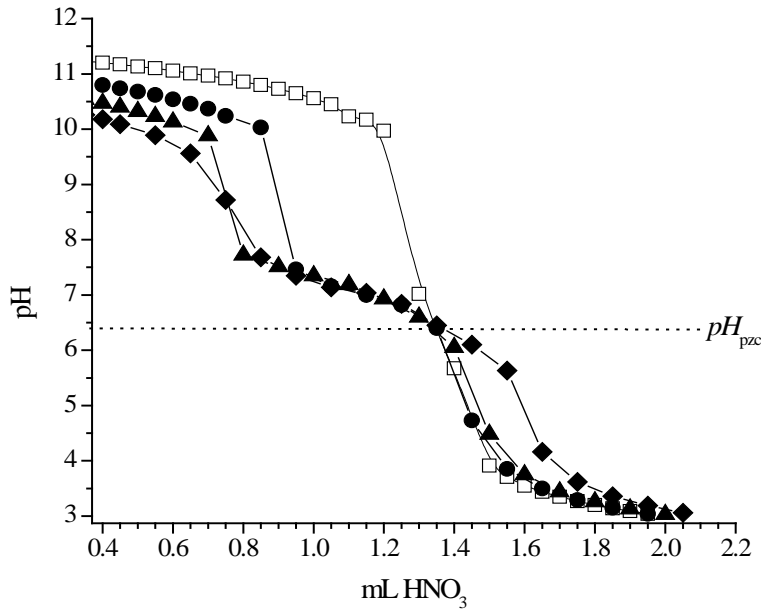


Gráfico 3.1 Curvas de titulación experimentales obtenidas por el método de titulación de masa potenciométrica (PMT) para la determinación del pzc de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. (\square) Blanco sin biomasa; (\bullet) 5.4 mg de biomasa en 100 mL de KNO_3 ; (\blacktriangle) 8.2 mg de biomasa en 100 mL de KNO_3 y (\blacklozenge) 10.2 mg de biomasa en 100 mL de KNO_3 .

Esto quiere decir que la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE presentará grupos funcionales ionizables con carga negativa a pH superiores de 6.43. Mientras que a valores de pH por debajo de un valor de 6.43, la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE presentará grupos funcionales ionizables con carga positiva.

Durante el transcurso de la titulación de masa potenciométrica (PMT) de la biomasa de *R. oryzae* ENHE, se observaron siete puntos de inflexión en las curvas de titulación (gráfico 3.1). Cuatro de estos puntos se encontraron en condiciones ácidas, mientras que tres de ellos se encontraron en condiciones alcalinas. Los valores de pH correspondientes a estos puntos fueron 3.8 ± 0.07 , 4.16 ± 0.3 , 5.84 ± 0.30 , 6.86 ± 0.06 , 7.62 ± 0.14 , 9.82 ± 0.24 y 10.5 ± 0.30 .

Por otra parte, durante el transcurso de la titulación se observó que la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE presenta una zona donde no se observan grandes cambios de pH al incrementar el volumen del valorante. En esta zona, se agregó aproximadamente 1 mL de HNO_3 y se encuentra entre el pH 5.5 y 8.0 (gráfico 3.1). La gran cantidad de grupos funcionales ionizables de la biomasa seca hacen que en esta zona la biomasa amortigüe los

cambios de pH haciéndolos lentos, ya que se requirieron entre 20 y 40 min para obtener una lectura de pH estable en la fase acuosa, después de la adicción de un volumen de ácido. A partir de pH 8.0, la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE tendió naturalmente a disminuir el pH de la fase acuosa hasta el pH de equilibrio, el pH_{pzc} . Mientras que a pH 5.5, la biomasa seca del hongo tendió a incrementar el pH de la solución hasta alcanzar el equilibrio.

3.4.3 Estudios cinéticos de biosorción de PCF

En el gráfico 3.2 se muestra el perfil cinético de sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. Se observa que la sorción de PCF es rápida. De hecho, el equilibrio de sorción se alcanzó a partir de los primero 30 min de contacto. En el equilibrio, la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE sorbió el 34.8, 29.8 y el 18.1% del PCF inicial en los experimentos realizados a pH iniciales de 5.0, 6.0 y 8.0, respectivamente.

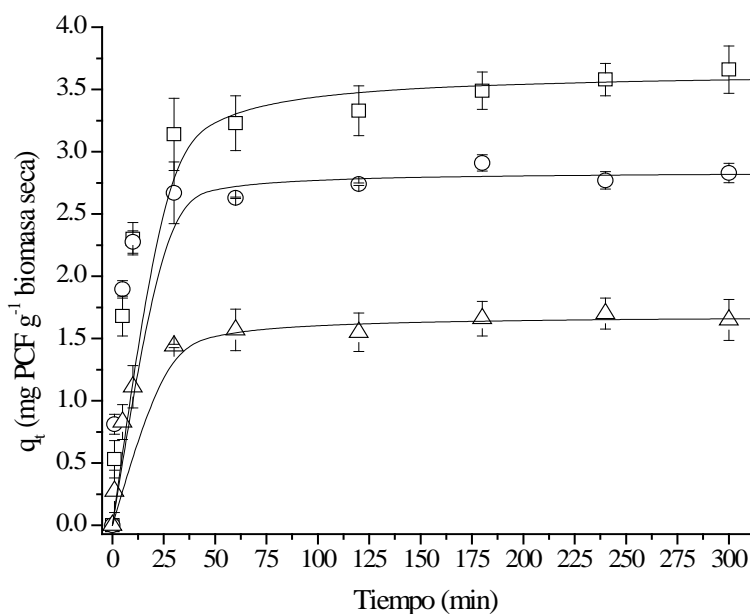


Gráfico 3.2 Efecto del pH sobre la velocidad de sorción de PCF en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE usando el modelo cinético de pseudo-segundo orden. (□) pH 5.0; (○) pH 6.0 y (Δ) pH 8.0.

Los parámetros cinéticos y estadísticos obtenidos de los modelos descritos por Lagergren [91] y Ho [48] se listan en la tabla 3.2. Ambos modelos cinéticos de sorción se ajustaron bien a los resultados experimentales ($R^2 > 0.98$). Sin embargo, el modelo de pseudo-segundo orden fue el que mejor describió los resultados experimentales, ya que fue el modelo donde

se observó la menor variación experimental entre los valores predichos por el modelo y los valores experimentales (tabla 3.2). El modelo cinético de pseudo-segundo orden presentó los mayores valores de coeficiente de determinación (R^2) y los menores valores de Chi-cuadrada (χ^2) en cada uno de los pH utilizados. El anexo B muestra las capacidades de sorción de PCF experimentales obtenidas con respecto al tiempo modeladas con el modelo de Lagergren.

Tabla 3.2 Parámetros cinéticos de biosorción y estadísticos calculados por regresión no lineal para la sorción de PCF en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE usando diferentes pH.

Modelo	Parámetros	pH		
		5.0	6.0	8.0
Lagergren	q_e (mg g ⁻¹)	3.4626	2.7519	1.6095
	k_1 (min ⁻¹)	0.1180	0.2318	0.1293
	R^2	0.9841	0.9824	0.9857
	χ^2	0.1370	0.1423	0.0638
Ho	q_e (mg g ⁻¹)	3.6459	2.8409	1.6872
	k_2 (g mg ⁻¹ min ⁻¹)	0.0469	0.1412	0.1148
	h_{PCF} (mg min ⁻¹ g ⁻¹)	0.6234	1.1395	0.3268
	R^2	0.9968	0.9970	0.9978
	χ^2	0.0160	0.0099	0.0048

La velocidad de sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se vio fuertemente afectada por el pH. Las capacidades de sorción de PCF en el equilibrio obtenidas a partir del modelo de pseudo-segundo orden fueron 3.64, 2.84 y 1.68 mg PCF g⁻¹ biomasa seca para los experimentos de sorción que se realizaron a pH 5.0, 6.0 y 8.0, respectivamente (tabla 3.2).

A su vez, se observó que la velocidad inicial de sorción de PCF (h_{PCF}) a pH 6.0 (1.13 mg PCF min⁻¹ g⁻¹) fue la mayor en comparación a las velocidades iniciales de sorción a pH 5.0 y 8.0 (0.62 y 0.33 mg PCF min⁻¹ g⁻¹). A pH 5.0, la h_{PCF} fue 1.8 veces menor a la estimada a pH 6.0. Mientras que a pH 8.0, h_{PCF} fue 3.5 veces menor a la calculada a pH 6.0. Aparentemente, la sorción de PCF a pH 6.0 por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE es inicialmente más rápida que la sorción de PCF a pH 5.0 y 8.0. Sin embargo, una mayor cantidad de PCF puede ser sorbida por la biomasa seca del hongo a pH 5.0.

3.4.4 Estudios de isotermas

3.4.4.1 Isotermas de sorción de PCF con biomasa seca

Las capacidades de sorción (q_e) de PCF obtenidas experimentalmente a pH 5.0, 6.0 y 8.0, se ajustaron a los modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich y Redlich-Peterson. Los valores de los parámetros de las isotermas y los parámetros estadísticos calculados con las q_e de PCF experimentales se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Parámetros de isotermas de sorción y estadísticos calculados por medio de regresión no lineal para la sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE a diferentes valores de pH.

Modelo	Parámetros	pH		
		5.0	6.0	8.0
Langmuir	q_m (mg g ⁻¹)	16.9901	7.6378	2.0397
	K_a (L mg ⁻¹)	0.0505	0.0711	1.5212
	R ²	0.9884	0.9815	0.9916
	χ^2	0.0634	0.047	0.0126
Freundlich	K_F (mg g ⁻¹)(L mg ⁻¹) ^{1/n}	0.9385	0.6813	1.4541
	1/n	0.7967	0.6699	0.1279
	R ²	0.9919	0.9765	0.9925
	χ^2	0.0429	0.0600	0.0112
Redlich-Peterson	g (L mg ⁻¹) ^{1/n}	0.4104	0.5809	0.9411
	A (L g ⁻¹)	1.3572	0.8550	5.1894
	B	0.5157	0.4436	2.9587
	R ²	0.9910	0.9784	0.9920
	χ^2	0.0477	0.0555	0.0119

Como se observa en la tabla 3.3, las tres isotermas de sorción se ajustaron correctamente a las q_e experimentales, ya que en las regresiones no lineales se obtuvieron grandes valores de R² y valores bajos de χ^2 ; para cada una de las isotermas en cada uno de los pH. Por lo cual, fue difícil concluir que modelo de isoterma se ajustó mejor a los resultados experimentales sólo con los parámetros estadísticos. El gráfico 3.3 muestra las representaciones gráficas de las isotermas de biosorción de PCF en función del pH. Las capacidades de sorción de PCF experimentales en el gráfico 3.3 fueron modeladas con la ecuación de Redlich-Peterson. El anexo C muestra las isotermas de biosorción de PCF modeladas con las ecuaciones de Langmuir y Freundlich.

Utilizando la información obtenida con la isoterma de Langmuir (tabla 3.3), se encontró que las capacidades máximas de sorción (q_m) de PCF fueron 16.99, 7.64 y 2.03 mg PCF g⁻¹

biomasa seca para las isothermas realizadas a pH 5.0, 6.0 y 8.0, respectivamente. La q_m obtenida a pH 8.0 fue 8.4 veces menor a la q_m obtenida a pH 5.0. Lo cual indica que en condiciones ácidas, la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE muestra mayor capacidad de sorción de PCF (gráfico 3.3).

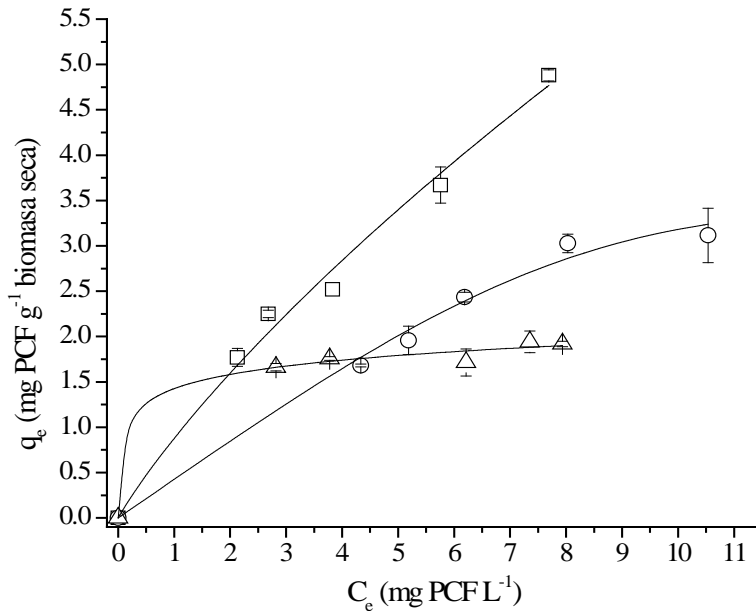


Gráfico 3.3 Capacidad de sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE en función del pH de la fase acuosa modelada con la isoterma de Redlich-Peterson. (□) pH 5.0; (○) pH 6.0 y (Δ) pH 8.0.

Con la isoterma de Freundlich, se encontró que la capacidad de sorción de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE (K_F) fue de 0.94, 0.68 y 1.45 a pH 5.0, 6.0 y 8.0, respectivamente. En la isoterma de sorción de PCF realizada a pH 8.0, a partir de los 2.8 mg PCF L⁻¹ en el equilibrio, la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE sorbió constantemente la misma cantidad de PCF, independientemente de la cantidad de biomasa seca (gráfico 3.3).

Al analizar las q_e experimentales con la isoterma de Redlich-Peterson, se estimó que los valores de g fueron de 0.41, 0.58 y 0.94, para las isothermas realizadas a pH 5.0, 6.0 y 8.0, respectivamente. Lo cual indicó que la sorción realizada a pH 5.0 y 6.0 posiblemente se describe mejor por la isoterma de Freundlich. Mientras que la sorción de PCF realizada a pH 8.0, posiblemente se describe mejor por la isoterma de Langmuir.

3.4.4.2 Isotermas de sorción de PCF con biomasa húmeda

La capacidad de sorción de PCF por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE se estudió en soluciones amortiguadas a pH 3.3 y 7.5. Con la finalidad de evitar la degradación del PCF por el metabolismo del hongo, se desactivó a la biomasa por medio de calor. Con el tratamiento térmico, se obtuvo una biomasa sin ninguna capacidad metabólica intrínseca, lo cual permitió estimar la cantidad de PCF retenido por micelio. Las capacidades de sorción de PCF (q_e) experimentales se ajustaron a las isotermas de Langmuir y Freundlich.

El gráfico 3.4 muestra el perfil de sorción de PCF a pH 3.3 con biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE.

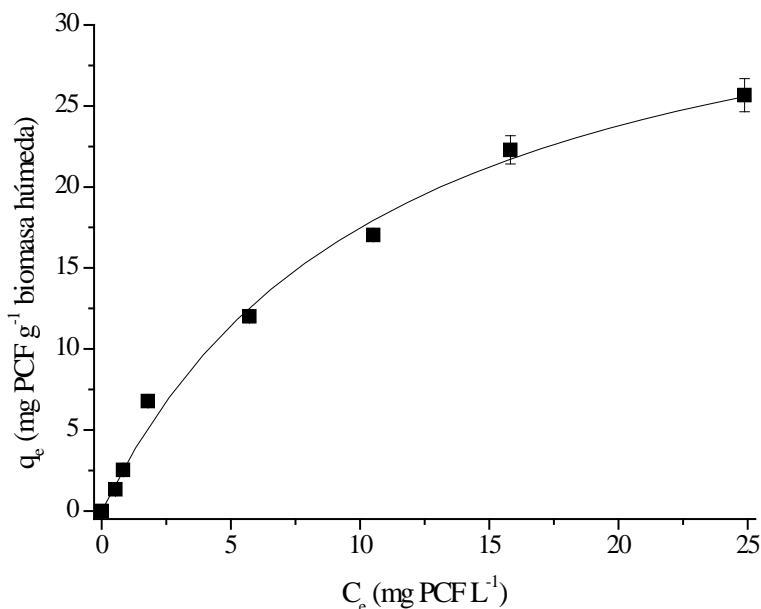


Gráfico 3.4 Capacidad de sorción de PCF por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 3.3. Ajuste de los resultados experimentales con la isoterma de Langmuir.

Como se observa en el gráfico 3.4, la q_e de PCF aumentó a medida que incrementó la concentración de PCF en el equilibrio. De hecho, se observa que la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE comenzó a saturarse de PCF a medida que la concentración del plaguicida aumentó en la fase acuosa.

Tabla 3.4 Parámetros de sorción de PCF de la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE obtenidos por regresión no lineal de los resultados experimentales con los modelos teóricos de Langmuir y Freundlich.

Modelo	Parámetros	pH	
		3.3	7.5
Langmuir	q_m (mg g ⁻¹)	37.090	11.924
	K_a (L mg ⁻¹)	0.0089	0.0132
	R^2	0.9935	0.9968
	χ^2	0.70	0.06
Freundlich	K_F (mg g ⁻¹)(L mg ⁻¹) ^{1/n}	4.3433	0.2611
	$1/n$	0.5682	0.7406
	R^2	0.9863	0.9984
	χ^2	1.69	0.03

Los resultados experimentales de biosorción de PCF a pH 3.3 se ajustaron bien, por regresión no lineal, a los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich. Sin embargo, el modelo que predijo la biosorción de forma más correcta fue el Langmuir, debido al valor de R^2 y a su menor valor de χ^2 (tabla 3.4). Según la estimación obtenida con el modelo de Langmuir, la capacidad máxima de sorción (q_m) de PCF a pH 3.3 por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE fue de 37.09 mg PCF g⁻¹ biomasa húmeda. Considerando una confianza del 95% ($\alpha = 0.05$) en la regresión no lineal, se estimó que la q_m de PCF a pH 3.3 por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE se encontrará entre 30.50 y 43.67 mg PCF g⁻¹ biomasa húmeda. El anexo D muestra el ajuste de las capacidades de sorción de PCF experimentales en la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 3.3 con la isoterma de Freundlich.

El gráfico 3.5 muestra la capacidad de sorción de PCF a pH 7.5 por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE.

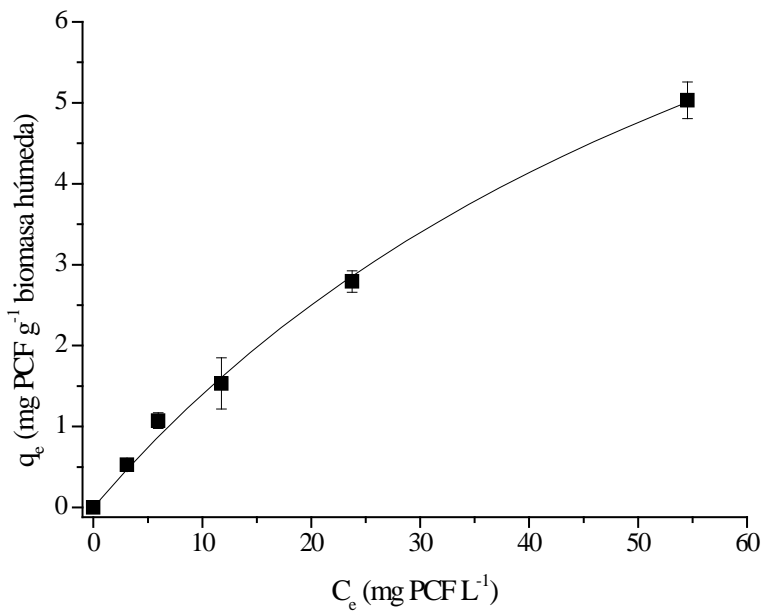


Gráfico 3.5 Capacidad de sorción de PCF por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 7.5. Ajuste de los resultados experimentales con la isoterma de Freundlich.

En el gráfico 3.5 se observa que la capacidad de sorción de PCF a pH 7.5 de la biomasa húmeda del hongo es menor a la observada a pH 3.3. De hecho, grandes concentraciones de PCF fueron cuantificadas en la fase acuosa en el equilibrio. Lo cual, no sucedió en los experimentos de biosorción realizados a pH 3.3. La biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE puesta en contacto con el PCF a pH 7.5, también mostró una tendencia hacia la saturación. Sin embargo, no fue posible llegar hasta ese punto.

Las q_e de PCF experimentales obtenidas a pH 7.5 se ajustaron de forma más precisa a la isoterma de Freundlich en comparación a la isoterma de Langmuir. Esto debido principalmente al menor valor de χ^2 obtenido en el análisis por regresión no lineal (tabla 3.4). El anexo D muestra el ajuste de las capacidades de sorción de PCF experimentales en la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 7.5 con la isoterma de Langmuir.

La capacidad de sorción de PCF (K_F) a pH 7.5 calculada con la isoterma de Freundlich fue de 4.34. Mientras que la q_m de PCF estimada con la isoterma de Langmuir a pH 7.5 fue en promedio de 11.92 mg PCF g⁻¹ biomasa húmeda. Sin embargo, al realizar el análisis de regresión no lineal con un nivel de confianza del 95% se infirió que la q_m de PCF a pH 7.5

por la biomasa húmeda del hongo se encontrará entre 8.05 y 15.75 mg PCF g⁻¹ biomasa húmeda.

3.4.5 Efecto de la temperatura sobre la biosorción de PCF en biomasa seca

Los estudios de sorción de PCF en función de la temperatura se realizaron para comprender la interacción de las moléculas de PCF con la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. Desde un punto de vista termodinámico, el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG^0) indica la espontaneidad de una reacción química. Una reacción química ocurre espontáneamente a una determinada temperatura, si el valor de ΔG^0 presenta un valor negativo. Mientras que si el valor de ΔG^0 es positivo, la reacción no se lleva a cabo de forma espontánea. El valor de ΔG^0 puede ser calculado usando la ecuación de Gibbs, la cual se representa de la siguiente forma:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad \text{Ec.11}$$

Donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta (Kelvin), y K es la constante de equilibrio del proceso de sorción. Asumiendo que la actividad de solvente (agua) presenta un valor de uno, la constante de equilibrio se puede asociar con la constante K_a obtenida de la isoterma de Langmuir [92]. Considerando que los cambios de temperatura durante el proceso de sorción afectan directamente al valor de K_a , se puede utilizar la ecuación de van't Hoff para determinar los cambios en la entalpia (ΔH^0) y en la entropía (ΔS^0) durante el proceso de sorción. La ecuación utilizada para obtener los valores de ΔH^0 y ΔS^0 es:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{Ec. 12}$$

Al graficar los valores de ΔG^0 obtenidos experimentalmente *versus* la temperatura (K), se obtiene una respuesta lineal. Los valores de ΔH^0 y ΔS^0 se obtienen de la pendiente e intersección de la gráfica, respectivamente [93].

El efecto de la temperatura sobre la biosorción de PCF en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se evaluó a pH 5.0 y a diferentes temperaturas; 293.15, 298.25, 303.15, 308.15 y 313.15 K. La gráfica 3.6 muestra la relación lineal que guardan los valores experimentales de ΔG^0 en función de la temperatura en la biosorción de PCF. Al variar la temperatura, la

Capítulo 3

constante de equilibrio de Langmuir (K_d) incrementó de 0.046 L mg^{-1} PCF a 293.15 K hasta 0.068 L mg^{-1} PCF a 313.15 K . Mientras que los valores ΔG^0 disminuyeron de -22.9 a $-25.5 \text{ KJ mol}^{-1}$, al incrementar la temperatura de 293.15 K a 313.15 K , respectivamente (gráfico 3.6). Los valores negativos de ΔG^0 obtenidos en la sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE confirmaron que la sorción de PCF es espontánea [94].

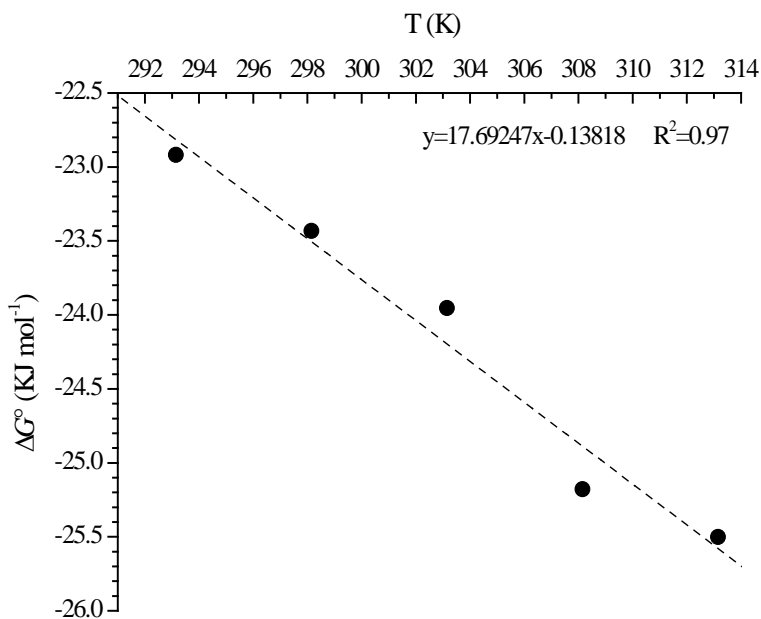


Gráfico 3.6 Cambios de la energía libre de Gibbs *versus* la temperatura en la biosorción de PCF en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE.

Al variar la temperatura en la sorción de PCF en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se encontró que la biosorción se realiza por interacciones débiles y requiere energía para llevarse a cabo, ya que es endotérmica y presenta un valor de ΔH^0 de $17.69 \text{ KJ mol}^{-1}$. Además, el proceso de sorción presentó un valor de ΔS^0 de $0.138 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

3.4.6 Grupos funcionales presentes en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE

Los grupos funcionales presentes en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se obtuvieron por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, acrónimo en inglés). Se identificaron los grupos funcionales de la biomasa de *R. oryzae* ENHE que estuvo en contacto con PCF a pH 5.0 y se compararon con los grupos funcionales de biomasa que no estuvo en contacto con PCF (control). Con la finalidad de identificar los grupos funcionales

relacionados con la sorción de PCF en la biomasa. Los espectros infrarrojos (IR) obtenidos en las biomazas de *R. oryzae* ENHE se muestran en el gráfico 3.7.

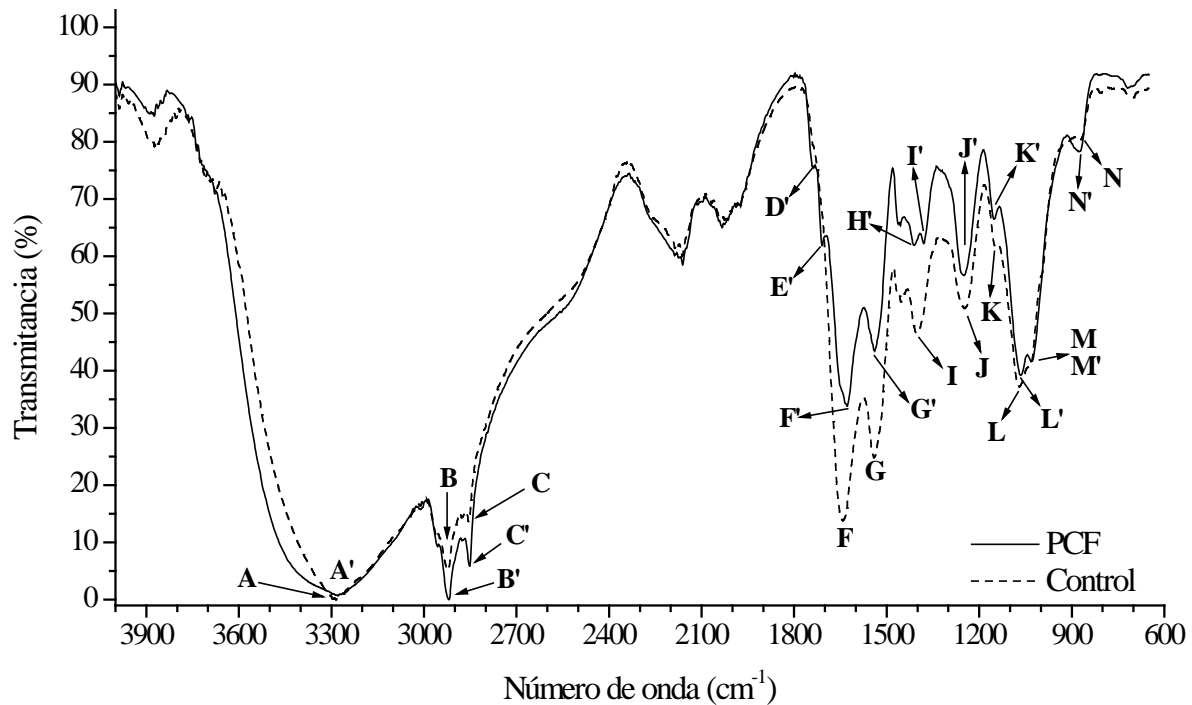


Gráfico 3.7 Espectros FT-IR de biomasa seca de *R. oryzae* ENHE en presencia (—) y ausencia (---) de PCF. Tanto la biomasa con PCF como la biomasa control estuvieron re-suspendidas en una solución a pH 5.0.

Las bandas marcadas en los espectros IR con letras mayúsculas y un apóstrofe (A', B' y así sucesivamente) corresponden a la biomasa de *R. oryzae* ENHE que estuvo en contacto con PCF, mientras que las bandas marcadas con letras mayúsculas sin apóstrofe (A, B y así sucesivamente) corresponden a la biomasa del hongo que no estuvo en contacto con PCF, control. La tabla 3.5 muestra el tipo de enlace encontrado para cada una de las bandas mostradas en los espectros IR del gráfico 3.7.

Tabla 3.5 Bandas encontradas en los espectros IR de la biomasa de *R. oryzae* ENHE en presencia y ausencia de PCF.

Número de onda		Banda	Características	Referencia
Biomasa control	Biomasa con PCF			
3284.6 (A)	3278.2 (A')	N-H O-H	La región entre 3200 y 3500 cm ⁻¹ se caracteriza por la superposición de picos con vibración por estiramiento	[94-99]
2924.5 (B)	2919.4 (B')	C-H	Vibraciones por estiramiento de cadenas alquílicas.	
2855.1 (C)	2851.6 (C')			
-----	1736 (D')	C=O	Hombro cercano a 1700-1740 cm ⁻¹ indica la presencia de grupos C=O, posiblemente de aminoácidos	
-----	1709.5 (E')	C=O		
1641.3 (F)	1628.1 (F')	C=O	Vibraciones por estiramiento de grupos C=O pertenecientes a amidas primarias	
1541.2 (G)	1539.3 (G')	O=C-N-H C-N	Estas bandas son debidas a la vibración por aleteo de O=C-N-H de la quitina y quitosan. Aunque pueden ser debidas a la vibración por estiramiento de C-N en superposición con la vibración asimétrica de COO- de carboxilatos	
-----	1411.6 (H')	COO- -SO ₂ -N	Presencia de grupos carboxilos o sulfamida	
1401.2 (I)	1379.7 (I')	N-H -SO ₂ -N	Vibraciones por estiramiento de amidas terciarias o sulfamidas.	
-----	1379.7 (I')	C-H	Posible deformación de C-H	
1248.2 (J)	1249.4 (J')	C-O	Vibraciones por estiramiento de C-O pertenecientes a ácidos carboxílicos	
1148.3 (K)	1152.3 (K')	P=O -SO ₂	Puede deberse a un grupo P=O o a un grupo -SO ₂	
1070 (L)	1065.9 (L')	-PO ₄ ⁻³	Posiblemente debida a un grupo fosfato	
1035 (M)	1030.9 (M')	P-OH	Posiblemente pertenecen a grupos P-OH	
873.3 (N)	876.1 (N')	N-H y C-H	Bandas representativas de balanceo grupos N-H y C-H	
804.6 (O)	-----			

En términos generales, se encontraron los mismos grupos funcionales en la biomasa control y en la biomasa con PCF sorbido (tabla 3.5 y gráfico 3.7). Sin embargo, la biomasa con PCF presentó algunos grupos funcionales que no pudieron ser identificados en la biomasa control, los cuales fueron; una par de bandas encontradas a 1736 cm⁻¹ y 1709.5 cm⁻¹ (marcados con D' y E', respectivamente) que indican la presencia de grupos C=O [97, 100]. Y una banda observada a 1411.6 cm⁻¹ (marcada con H') que posiblemente se deba a

grupos carboxilo (COO-) en la biomasa [96]. No obstante, se ha reportado que en la biomasa de *Aspergillus niger* una banda cercana a 1414 cm^{-1} es producida por una sulfamida, $-\text{SO}_2\text{-N}$ [95].

En el espectro FT-IR de la biomasa de *R. oryzae* ENHE con PCF sorbido se observaron algunas bandas que presentaron un desplazamiento en su patrón de adsorción en comparación a las bandas encontradas en la biomasa control (tabla 3.5 y gráfico 3.7). En la biomasa control se encontraron bandas a 3284.6 cm^{-1} (hidroxilos o aminas), 1641.3 cm^{-1} (C=O de amidas primarias), 1402.1 cm^{-1} (amidas terciarios o sulfonamidas), las cuales se desplazaron a 3278.2 cm^{-1} (marcada con A'), 1628.1 cm^{-1} (marcada con F'), 1379.7 cm^{-1} (marcada con I') en la biomasa con PCF sorbido, respectivamente.

3.5 Discusión

La biosorción es un proceso fisicoquímico donde interactúa un soluto con un sólido de origen biológico, ya sea de forma física o química. El proceso de biosorción depende de variables como: la temperatura, la fuerza iónica, la dosis de biosorbente, el pre-tratamiento del biosorbente, la concentración del soluto, tiempo de agitación, tiempo de contacto y el pH, entre otros [34, 101-105]. El pH es una variable clave para entender el comportamiento químico de los solutos en solución, así como para interpretar la carga eléctrica de los grupos funcionales presentes en el biosorbente. Por esta razón, cambios significativos en el pH de la fase acuosa durante un proceso de biosorción podrían mejorar o limitar la interacción de un soluto con las partículas del biosorbente. Las propiedades químicas de los solutos, así como las cargas eléctricas inherentes de los grupos funcionales en los biosorbentes (tradicionalmente secos y pulverizados), pueden llegar a modificar el pH de la fase acuosa que los contiene, si la fase no está amortiguada.

En la biosorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE, a la fase acuosa se le ajustó el pH con NaOH y HCl, pero no se amortiguó. Debido a que en condiciones normales, fuera de los límites de un laboratorio, es imposible amortiguar los efluentes industriales contaminados con clorofenoles. Por lo que es relevante caracterizar la sorción de un clorofenol como el PCF, en condiciones no ideales.

Capítulo 3

El PCF y la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE modificaron el pH inicial de las fases acuosas durante el transcurso de la biosorción. El pH en el equilibrio (al final de la sorción) fue de entre 6 y 6.5, independientemente del pH inicial. Koumanova *et al.*, [106] estudiaron la biosorción de clorofenoles (*p*-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 3,5-diclorofenol) con biomasa de *R. oryzae* (IMI 266680) a pH 6.0 y observaron que inicialmente los clorofenoles y la biomasa del hongo no modificaron el pH de la fase acuosa. Sin embargo, al final de la sorción, el pH de la fase acuosa cambió a neutro.

Los cambios de pH durante el proceso de sorción de PCF con biomasa seca de *R. oryzae* ENHE pueden ser explicados por el grado de ionización de los grupos funcionales de la biomasa. La biomasa pulverizada de *R. oryzae* ENHE presentó un pzc a un pH de 6.43 ± 0.3 . En el pH_{pzc} , las cargas eléctricas de la biomasa se encuentran en equilibrio, es decir que en el pH_{pzc} coexiste igual número de cargas positivas y negativas. Por el contrario, a $pH < pH_{pzc}$ las cargas eléctricas de los grupos funcionales de la biomasa son preferentemente positivas, mientras que a $pH > pH_{pzc}$ las cargas eléctricas son en su mayoría negativas [36]. Durante el transcurso de la titulación de masa potenciométrica (gráfico 3.1), se encontró una zona entre pH 8 y 5.5 donde se produce un amortiguamiento del pH, causado por el gran número de grupos funcionales ionizables de la biomasa. Dentro de esta zona, existe una tendencia natural a alcanzar el equilibrio de cargas en la biomasa; en otras palabras, el pzc . En soluciones no amortiguadas, con un pH cercano o dentro del intervalo de pH donde se encuentra la zona de amortiguamiento de la biomasa, los grupos funcionales ionizables de la biomasa, en mayor o menor medida, se protonan o desprotonan hasta alcanzar el pzc , causando una disminución o aumento del pH inicial de la fase acuosa. Por esta razón, el pH de la fase acuosa al final de los experimentos, independientemente del pH inicial, siempre presentó valores de pH cercanos al pH_{pzc} .

El pH_{pzc} estimado para la biomasa de *R. oryzae* ENHE difiere del pH_{pzc} estimado por Das *et al.*, [107] para la biomasa liofilizada de *R. oryzae* (MTCC 262), utilizada en la biosorción de Rodamina B. Das *et al.*, [107] estimaron un pH_{pzc} de 3.5. Probablemente, la variación del valor de pH_{pzc} sea debida al tipo de cepa de *R. oryzae*, a las condiciones de cultivo y al pre-tratamiento de la biomasa. En general, las biomasas fúngicas presentan valores de pH_{pzc} entre 3.5 y 3.8 [108, 109]. Mientras que algunas biomasas de origen no fúngico han

presentado valores de pH_{pzc} similares al estimado en la biomasa de *R. oryzae* ENHE, como fue reportado por Ahmady-Asbchin *et al.*, [110] para el alga café *Fucus serratus*, a la cual se le estimó un pH_{pzc} de 6.3 ± 0.2 .

Por otro lado, la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE resultó ser un biosorbente con afinidad por las moléculas del PCF, ya que la biomasa seca del hongo alcanzó el equilibrio de sorción en menos de 30 min de contacto; por lo menos en un intervalos de pH entre 5.0 y 8.0. Otros tipos de biosorbentes de origen microbiano han sido utilizados para la sorción de PCF y han alcanzado su equilibrio de sorción en un intervalo de 2 a 6 h [94, 111-113].

Previamente, Tsezos y Bell [114] estudiaron la biosorción de PCF con biomasa viva y muerta de *Rhizopus arrhizus*. Ellos encontraron que en 24 h de contacto, la biomasa viva y muerta del zigomiceto sorbió 0.8 y 4.8 mg PCF g^{-1} biomasa, respectivamente. En este trabajo de investigación, se encontró que la biomasa de *R. oryzae* ENHE sorbió 3.64 mg PCF g^{-1} biomasa en 30 min de contacto, lo cual indica una sorción 48 veces más rápida en comparación a la observada con la biomasa de *R. arrhizus*.

Los datos de biosorción de PCF por la biomasa de *R. oryzae* ENHE se ajustaron de forma correcta, por regresión no lineal, a los modelos cinéticos de pseudo-primer y segundo orden ($R^2 > 0.98$). Sin embargo, la menor variación entre las capacidades de sorción experimentales y las predichas por el modelo de pseudo-segundo orden demostraron que el modelo cinético propuesto por Ho [48] fue el más indicado para describir el perfil cinético de sorción de PCF por la biomasa seca del hongo; en los tres pH en donde se evaluó la sorción. Con el modelo cinético del pseudo-segundo orden, en la sorción realizada a pH 5.0, se estimó una capacidad de sorción de PCF en el equilibrio (q_e) 3.7 veces superior a la reportada previamente por Mathialagan y Viraraghavan [94] con biomasa *A. niger* mejorada químicamente.

Con la isoterma de Langmuir se estimó, por regresión no lineal, que la capacidad máxima de sorción (q_m) de PCF en la biomasa de *R. oryzae* ENHE fue 8.4 veces menor a pH 8.0 en comparación a la q_m calculada a pH 5.0. Lo cual comprobó que la capacidad de sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE es mayor en condiciones ácidas que en condiciones alcalinas. Estos resultados concuerdan con los resultados de biosorción de PCF

Capítulo 3

en biomazas fúngicas y bacterianas reportados, previamente [27, 94, 113]. La isoterma de Langmuir predijo la capacidad de sorción de PCF a pH 8.0, ya que el valor g de la isoterma de Redlich-Peterson mostró ser muy cercano a la unidad. Para la biosorción a pH 5.0 y 6.0, la isoterma de Freundlich fue el modelo matemático que mejor predijo la capacidad de sorción de PCF por la biomasa de hongo, ya que el valor de g de Redlich-Peterson no fue cercano a la unidad.

Al igual que la carga eléctrica de la biomasa y la capacidad de sorción de PCF, la solubilidad del PCF también se afectó por el pH. La solubilidad del PCF depende ampliamente del pH de la fase acuosa [27, 115]. El pK_a de PCF es 4.75. A un pH igual al pK_a , el 50% del PCF se encuentra en forma neutra (PCF no dissociado) y el otro 50% su forma aniónica. A pH 5.0, aproximadamente el 36% del PCF se encuentra en forma no dissociada. Mientras que a pH 8.0, el 99.9% del PCF está en su forma aniónica [27].

La menor capacidad de sorción de PCF de la biomasa de *R. oryzae* ENHE se encontró a pH alcalino. A pH 8.0, el PCF se encuentra principalmente en forma aniónica y la biomasa del hongo posee carga negativa. Por lo tanto, se presentan repulsiones electrostáticas entre el PCF aniónico y los grupos funcionales, causando una disminución de la capacidad de sorción de PCF [94, 116]. De igual manera, fuerzas de repulsión electrostática puede presentarse entre el PCF aniónico sorbido y el PCF aniónico libre, disminuyendo aún más la capacidad de sorción de la biomasa [117]. Sin embargo, a pH 5.0, el 36% del PCF se encuentra en forma neutra y la biomasa posee carga positiva, por lo que existen menos fuerzas de repulsión electrostáticas entre la biomasa y el PCF, lo cual provoca un aumento en la capacidad de sorción del PCF en la biomasa de *R. oryzae* ENHE. Cuando las especies neutras del PCF se sorben en la biomasa, las moléculas aniónicas del PCF en la fase acuosa rápidamente se equilibran para formar moléculas de PCF neutro que probablemente se sorberán en la biomasa fúngica.

Como se describió anteriormente, el pH inicial en los experimentos de sorción cambió después de la adición del PCF y la biomasa. En los experimentos realizados a pH 5.0, en el equilibrio, se alcanzó un pH de 6.2. En estas condiciones experimentales, la biomasa de *R. oryzae* ENHE está protonada, lo cual incrementa la interacción del PCF con los sitios activos de sorción por medio de mayores fuerzas de atracción, incrementando así la

capacidad de sorción; como fue descrito por Aksu y Yener [29] y Mathialagan y Viraraghavan [94].

En la biomasa de *R. oryzae* ENHE, por la titulación de masa potenciométrica (PMT), se lograron identificar parcialmente cinco grupos funcionales con base en su pK_a . Cada uno de estos grupos funcionales representó un punto de inflexión en la curva de titulación (gráfico 3.1). Los grupos funcionales ácidos parcialmente identificados fueron carboxilos (pK_a 1.7-4.7), imidazoles (pK_a 5.5-6.0), fosfatos (pK_a 6.1-6.8); y los grupos alcalinos fueron aminas o sulfidrílos (pK_a 8-11) e hidroxilos (pK_a 9.5-13) [118]. Mediante espectrometría de infrarrojo (IR) se corroboró la existencia de cadenas alquílicas, carboxilos, aminas, hidroxilos, fosfatos y sulfatos en las moléculas que integran la estructura de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. Probablemente, los grupos funcionales implicados en la sorción de PCF son hidroxilos, aminas, amidas terciarias o sulfonamidas, ya que las bandas correspondientes a estos grupos funcionales presentaron un desplazamiento en su patrón de adsorción (número de onda) en la biomasa con PCF sorbido, en comparación con la biomasa control. De manera similar a lo reportado por Deng *et al.*, [113] en la biosorción de PCF en la biomasa de *P. chrysogenum* aminada con polietilenimina.

La remoción del PCF en la biomasa de *R. oryzae* ENHE fue espontánea y se favoreció al aumentar la temperatura de incubación. Debido a que al aumentar la temperatura de 293.15 K a 313.15 K, la K_a incrementó 1.5 veces y los valores de ΔG^0 disminuyeron. Caso contrario a lo observado en la biosorción de PCF en la biomasa de *A. niger* tratada con bromuro de centiltrimetilamonio, donde la sorción fue más favorable a bajas temperaturas [94]. La interacción del PCF con los sitios activos de sorción de la biomasa de *R. oryzae* ENHE fue dependiente de energía, ya que esta interacción fue endotérmica ($\Delta H^0 = 17.69$ KJ mol⁻¹) y se llevó a cabo por interacciones débiles; posiblemente por puentes de hidrógeno [119]. A su vez, en la biosorción de PCF en la biomasa del zigomiceto, se incrementó la aleatoriedad de la interface sólido/soluto ($\Delta S^0 = 0.138$ KJ mol⁻¹ K⁻¹) [120].

3.6 Conclusiones

Este trabajo de biosorción es uno de los pocos donde se ha utilizado la biomasa de *R. oryzae*, sin ningún tratamiento químico, para la remoción de PCF. De los resultados experimentales obtenidos se puede concluir:

- En la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE las cargas eléctricas de los grupos funcionales están equilibradas a un pH de 6.43, por lo que a valores de pH cercanos al pH_{pzc} , la biomasa de *R. oryzae* ENHE presenta una capacidad amortiguadora.
- La capacidad de sorción de PCF de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se favorece a pH ácido, ya que un alto porcentaje de las moléculas de PCF están en forma neutra, y menos repulsión electrostática se lleva a cabo entre las moléculas del PCF y la biomasa fúngica.
- Desde el punto de vista cinético, el equilibrio de sorción de PCF en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE se alcanza en 30 min, y el modelo de pseudo-segundo orden de Ho es el que mejor describe la capacidad de sorción de PCF.
- La capacidad máxima de sorción (q_m) de PCF para la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE obtenida, se calculó con la isoterma de Langmuir a pH 5.0. Basándose en el análisis de regresión no lineal, se estimó que el valor de q_m de PCF obtenida a pH 5.0, se encuentra entre 9.31 y 17.45 mg PCF g^{-1} biomasa ($\alpha = 0.05$). Mientras que la q_m de PCF calculada a pH 8.0, se encuentra entre 1.99 y 2.18 mg PCF g^{-1} biomasa ($\alpha = 0.05$). Los estudios de isotermas de sorción mostraron que es imposible explicar la sorción de PCF en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE utilizando sólo un modelo de isoterma.
- La sorción de PCF en la biomasa de *R. oryzae* ENHE se realiza espontáneamente, es endotérmica y se lleva a cabo por interacciones físicas débiles. Posiblemente, los grupos amino e hidroxilo estén involucrados en la biosorción. Aunque no se descarta la posibilidad de que una fracción del PCF sea retenido en los lípidos de membrana del zigomiceto. Sin embargo, son necesarios más estudios aclarar dicho punto.

Capítulo 4

4 Respuesta metabólica a la presencia de PCF en los cultivos de *R. oryzae* ENHE

4.1 Metodología experimental

El efecto del PCF sobre el metabolismo de *R. oryzae* ENHE se estudió en cultivo líquido en función de la composición del medio de cultivo (fuentes de carbono y nitrógeno) y la cantidad inicial de PCF. Para estudiar la respuesta metabólica del hongo a la presencia del plaguicida se realizaron experimentos respirométricos; al igual que experimentos cinéticos donde se cuantificó la biomasa producida, el consumo de las fuentes de carbono y nitrógeno, los cambios de pH en el medio de cultivo y algunos intermediarios de la degradación de PCF formados durante los cultivos.

La glucosa (Glc) y el ácido glutámico (Glu) se utilizaron como fuentes de carbono, mientras que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el NaNO_3 se utilizaron como fuentes de nitrógeno [121]. Se trabajó con dos cantidades iniciales de PCF, las cuales fueron 0.5 mg y 2 mg (10 y 40 mg PCF L⁻¹, respectivamente).

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Medio de cultivo Lee doblemente concentrado (2X)

La concentración de sales del medio Lee utilizadas en este estudio fue el doble de las reportadas inicialmente por Lee *et al.*, [122]. Con la excepción de las fuentes de carbono y nitrógeno. La concentración de fuente de carbono permaneció igual a la reportada originalmente, mientras que la concentración de fuente de nitrógeno se disminuyó a la

Capítulo 4

mitad de su concentración original. La composición del medio 2X por litro fue: fuente de carbono (Glc o Glu), 5g; fuente de nitrógeno ((NH₄)₂SO₄ o NaNO₃), 2.5g; KH₂PO₄, 5g; MgSO₄, 4g y NaCl, 10g. Una vez disueltos los constituyentes del medio de cultivo, se ajustó el pH a 5.3 con HCl 0.1N y NaOH 0.1M.

4.2.2 Análisis respirométricos

Las respirometrías de los cultivos de *R. oryzae* ENHE se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL cerrados con válvulas Mininer. En los matraces se colocaron 10 mL del medio de cultivo Lee 2X (Glc-(NH₄)₂SO₄) con tres diferentes concentraciones de PCF; las cuales fueron: 5, 8 y 10 mg L⁻¹ (0.05, 0.08 y 0.125 mg de PCF). Además, se realizaron respirometrías en cultivos con 1 y 5 mg PCF L⁻¹ (0.01 y 0.05 mg de PCF) como únicas fuentes de carbono. Como control, se utilizaron cultivos sin PCF.

Los cultivos se inocularon con 1x10⁶ esporas mL⁻¹ y se mantuvieron en incubación a 30°C con una velocidad de agitación de 250 rpm por 196 h. Cada 24 h, se tomaron muestras de la fase gaseosa y acuosa para medir el CO₂, O₂, Glc.

4.2.3 Biodegradación de PCF

Los experimentos de biodegradación se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo Lee 2X, inoculados con 1x10⁶ esporas mL⁻¹. Los cultivos se incubaron a 30°C con una velocidad de agitación de 150 rpm. El PCF se adicionó a los cultivos a las 24 y 144 h en los cultivos con Glc-(NH₄)₂SO₄ y Glu-NaNO₃, respectivamente, para evitar la inhibición de la germinación de las esporas [123]. A cada cultivo, se le adicionó el PCF necesario para llegar a tener 0.5 mg y 2 mg de PCF (10 y 40 mg L⁻¹). Paralelamente, se realizaron controles (sin micelio del hongo) con 2 mg de PCF en 50 mL de medio Lee 2X.

Durante el transcurso de la biodegradación, se tomaron muestras del medio de cultivo para la cuantificación de las fuentes de carbono, el PCF y los intermediarios formados durante la degradación del PCF. Al final de los cultivos, 264 h en los cultivos con Glc-(NH₄)₂SO₄ y 436 h en los cultivos con Glu-NaNO₃, se separó la biomasa del zigomiceto del medio de cultivo por filtración al vacío y se liofilizó durante 6 a 8 h.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Cuantificación de CO₂ y O₂

La cuantificación de los gases producidos y consumidos durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE se realizó en un cromatógrafo de gases Gow Mac (serie 580, USA) acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD, acrónimo en inglés). Los gases presentes en la fase gaseosa de los cultivos (250 µL), se separaron en una columna concéntrica CTR1 (Alltech, USA). Las temperaturas de inyección, separación y detección fueron 50°C, 40°C y 115°C, respectivamente. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 70 ml min⁻¹.

La cuantificación del CO₂ se realizó con base en una curva de calibración con proporciones crecientes de CO₂ en aire, mientras que el O₂ y N₂ se cuantificaron en función de su proporción total en las muestras (anexo E).

4.3.2 Pre-tratamientos de muestras de medio de cultivo y biomasa

Las muestras del medio de cultivo y biomasa se sometieron a una serie de reacciones y extracciones con la finalidad de concentrar y hacer los compuestos clorados más afines a la cromatografía de gases (GC, acrónimo en inglés). Los tratamientos realizados a las muestras se resumen en la figura 4.1.

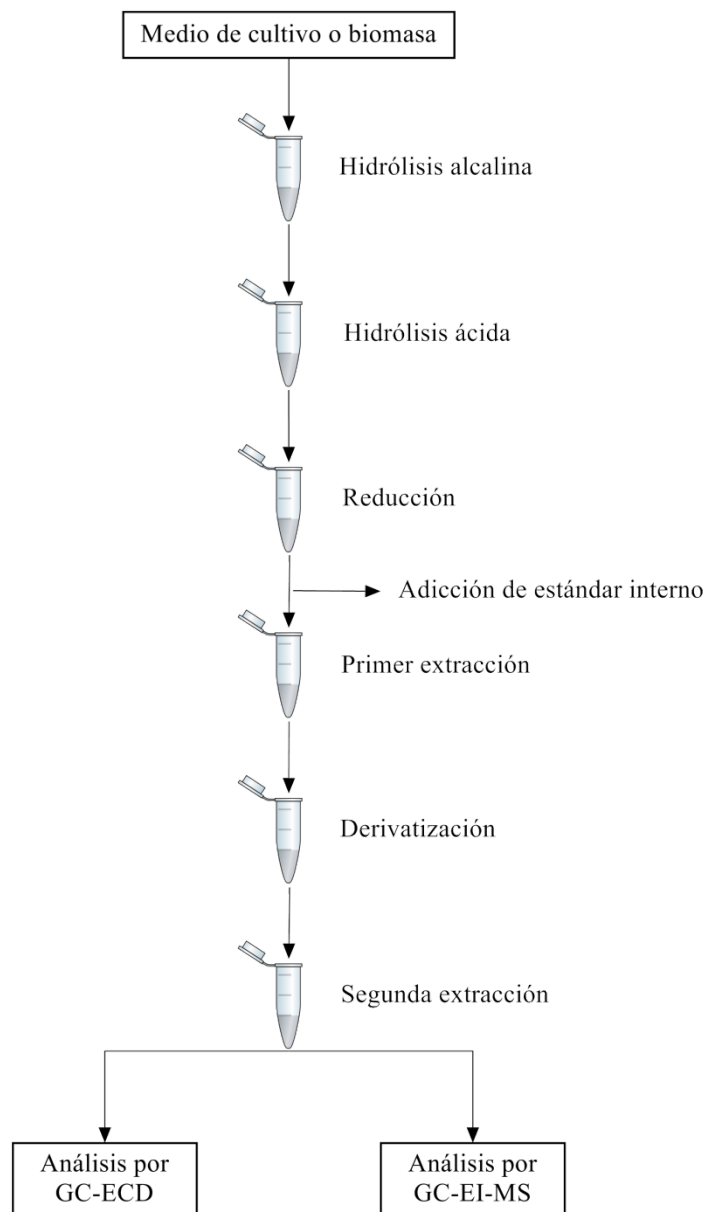


Figura 4.1 Representación esquemática de las etapas del tratamiento realizado a las muestras del medio de cultivo y biomasa liofilizada de *R. oryzae* ENHE.

4.3.2.1 Extracción de PCF e intermediarios clorados del medio de cultivo

El procedimiento experimental seguido para la extracción de los compuestos clorados del medio de cultivo se realizó como se describe a continuación.

- 1) Las muestras del medio de cultivo se centrifugaron durante 10 min a $12,000 \times g$.

- 2) Se tomaron 500 μL del medio de cultivo centrifugado, se adicionaron 370 μL de NaOH 4M con EDTA 100 mM y se calentaron a 96°C por 2h.
- 3) Después de la hidrólisis alcalina, se agregaron 250 μL de HCl 12N y se calentaron a 90°C durante 3h.
- 4) Terminada la hidrólisis ácida, se agregaron 10 μL de estándar interno (IS, acrónimo en inglés) (40 ng).
- 5) Posteriormente, se adicionaron 100 μL de ditionito de sodio 0.5M para la reducción de las moléculas cloradas. La reducción se realizó por 20 min a temperatura ambiente.
- 6) Después de la reducción, se agregó NaCl hasta saturación y se agitó la solución resultante.
- 7) Finalmente, se extrajeron los compuestos clorados con dos extracciones sucesivas con CHCl_3 (500 μL cada una) y se evaporó el solvente a seco.

4.3.2.2 *Extracción de PCF e intermediarios clorados de la biomasa*

El procedimiento experimental que se llevó a cabo para la extracción de los compuestos clorados contenidos en la biomasa de *R. oryzae* ENHE fue el siguiente:

- 1) La biomasa liofilizada y pulverizada, 10 mg, se re-suspendió en 120 μL de agua desionizada y 380 μL de NaOH 4M con EDTA 100mM. La solución resultante se calentó a 96°C durante 2 h.
- 2) Terminada la hidrólisis alcalina, se adicionaron 250 μL de HCl 12N y se hidrolizó la solución durante 3 h a 90°C.
- 3) Al final de la hidrólisis ácida, se adicionaron 10 μL de IS (40 ng).
- 4) La solución anterior se redujo con 100 μL de ditionito de sodio 0.5M durante 20 min a temperatura ambiente, se agregó NaCl y se agitó.
- 5) Por último, se extrajeron los compuestos clorados de la fase acuosa con dos extracciones sucesivas con CHCl_3 y se evaporó el solvente a seco.

4.3.3 *Derivatización de clorofenoles*

La derivatización es una modificación química de una molécula para producir un nuevo compuesto con propiedades adecuadas para un análisis cromatográfico. En la derivatización, la estructura química de compuesto permanece igual, ya que sólo se modifican algunos grupos funcionales específicos. Estos cambios estructurales alteran las

propiedades físicas y químicas de las moléculas originales haciéndolas detectables y analizables [124].

En el caso del PCF y sus intermediarios clorados, la derivatización se realizó con anhídrido acético. La acetilación, como reacción de derivatización, tiene la ventaja de incrementar la estabilidad de compuestos que son térmicamente lábiles, produce derivados volátiles de moléculas que originalmente no lo son y permite la detección de los analitos en bajos niveles aumentando la sensibilidad del método cromatográfico [125].

El procedimiento experimental para derivatizar clorofenoles encontrados en las muestras de medio de cultivo y biomasa de *R. oryzae* ENHE se describe a continuación.

- 1) Las muestras secas obtenidas después de las extracciones con CHCl_3 , tanto del medio de cultivo como las de biomasa, se re-suspendieron en 60 μL de piridina y 60 μL de anhídrido acético. En ambos casos, la derivatización se realizó a 90°C durante 30 min.
- 2) Terminada la derivatización, se agregaron 200 μL de agua desionizada a las muestras y se homogenizaron.
- 3) Los derivados acetilados formados se extrajeron de la fase acuosa con 500 μL de hexanos.
- 4) Finalmente, las muestras provenientes de los extractos de biomasa se diluyeron 100 veces, mientras que los extractos de medio de cultivo se inyectaron directamente al cromatógrafo de gases después de la extracción con hexanos.

4.3.4 Identificación de los intermediarios de la degradación de PCF

4.3.4.1 Cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones

El PCF y sus intermediarios clorados se identificaron y cuantificaron por cromatografía de gases con un detector de captura de electrones (CG-ECD, acrónimo en inglés) en un cromatógrafo Clarus 500 (Perkin-Elmer, USA). Los derivados acetilados de los clorofenoles se separaron en una columna capilar PE-XLB (Perkin-Elmer, USA) de longitud 30 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor de película. Se utilizó como gas acarreador H_2 a un flujo de 2.4 ml min^{-1} . El volumen de inyección fue de 1 μL y se trabajó en modo de Split con un valor de 10. Para la separación de los clorofenoles acetilados se utilizó el siguiente gradiente de temperaturas:

- Temperatura inicial: 100°C durante 2 min
- Rampa 1: 15°/min hasta 175°
- Rampa 2: 5°/min hasta 230°
- Rampa 3: 40°/min hasta 270°, durante 5 min
- Tiempo de equilibrio de las columna 1 min

El detector ECD se mantuvo a una temperatura constante de 300°C y se utilizó N₂ a un flujo de 30 mL min⁻¹ para la generación de electrones.

La calibración se realizó dentro de un intervalo lineal de concentraciones con estándares de pentaclorofenol (PCF), pentacloroanisol (PCA), tetraclorohidroquinona (TCHQ) y 3,4,5-triclorofenol (3,4,5-TCF). El pentacloronitrobenceno (PCNB) se utilizó como estándar interno. Todos los estándares fueron acetilados, excepto el PCA y el PCNB, ya que estos compuestos presentan impedimento estérico para realizar la acetilación (anexo F).

4.3.4.2 Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas

Las muestras de biomasa producidas con Glc-(NH₄)₂SO₄ se analizaron por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas de cuadrupolo en un cromatógrafo Agilent 6890. Los analitos fueron ionizados por impacto de electrones (GC-EI-qMS, acrónimo en inglés). Los analitos se separaron en una columna HP-5MS (5% Fenil-metilpolisiloxano) de longitud 30 m, 250 µm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor de película. Como fase móvil se utilizó He a un flujo de 1.5 ml min⁻¹. El volumen de inyección fue de 1 µL y se trabajó sin Split. La separación de los analitos se alcanzó con el siguiente gradiente de temperaturas:

- Temperatura inicial: 100°C durante 2 min
- Rampa 1: 25°/min hasta 175°
- Rampa 2: 5°/min hasta 230°
- Rampa 3: 15°/min hasta 270°, durante 6 min
- Tiempo de equilibrio de las columna 0.25 min

La adquisición de los espectros de masa comenzó 2.50 min después del comienzo del análisis. Las muestras fueron analizadas en modo de escaneo completo a 50 Hz y en un

rango de 45-450 m/z. Las temperaturas de la fuente de electrones y el cuadrupolo fueron 230 y 150°C, respectivamente.

4.3.5 Cuantificación de las fuentes de carbono

En los cultivos de *R. oryzae* ENHE se utilizaron como fuentes de carbono a las moléculas de glucosa (Glc) y ácido glutámico (Glu). La concentración inicial de las fuentes de carbono en el medio de cultivo fueron 5 g L⁻¹. Durante el transcurso de los cultivos se tomaron muestras del medio de cultivo en determinados intervalos de tiempo para cuantificar dichas fuentes de carbono. Ambas fuentes de carbono se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución.

4.3.5.1 Cuantificación de glucosa (Glc)

La Glc se cuantificó por dos metodologías. En la primer metodología, se utilizó un analizador bioquímico YSI 2700 equipado con una membrana de policarbonato con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada (membrana YSI dextrosa). La reacción entre la Glc y la oxidasa produjo D-glucono- δ -lactona y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El analizador bioquímico YSI, mide el H₂O₂ producido durante la reacción enzimática con un ánodo de platino e infiere por estequiometría la concentración de Glc en las muestras.

En la segunda metodología, la Glc se cuantificó por HPLC con un detector de índice de refracción (RI). La separación de la Glc se realizó de modo isocrático en una columna Phenomenex[®] Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), la cual se mantuvo a una temperatura de 55°C durante el análisis. Se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 5mM con flujo de 0.45 mL min⁻¹. La detección de las moléculas de Glc se realizó a 40°C.

Antes de iniciar el análisis cromatográfico, las muestras del medio de cultivo se centrifugaron a 20,000 \times g por 10 min. Los sobrenadantes resultantes se filtraron con membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 μ m y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos. La calibración de Glc se realizó dentro de un intervalo lineal por el método de estándar externo con cinco niveles de estándar de glucosa (anexo G).

4.3.5.2 Cuantificación de ácido glutámico (Glu)

El Glu y en general los aminoácidos son cromóforos débiles, por lo que no absorben luz UV directamente. Para que puedan tener esta cualidad, es necesario derivatizar los

aminoácidos con otras moléculas que permitan la absorción de luz [126]. Para la cuantificación del Glu en el medio de cultivo, se realizó la derivatización con *orto*-ftalaldehído (OPA). La figura 4.2 muestra las etapas del pre-tratamiento de las muestras del medio de cultivo, así como el mecanismo de reacción del Glu con el OPA.

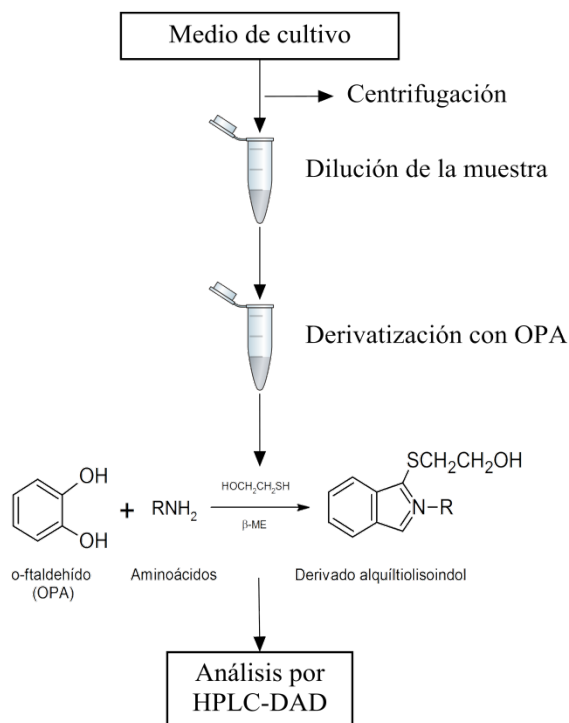


Figura 4.2 Etapas del pre-tratamiento realizado a las muestras de medio de cultivo para la cuantificación de Glu.

Los derivados Glu se separaron en una columna de fase reversa Nova-Pak[®] C18 (3.9x150 mm, 4µm) Waters. La metodología de separación se basó en la de Thippeswamy *et al.*, [127] con algunas modificaciones. Las fases móviles para la elución de los derivados de Glu fueron; como fase A, CH₃-COONa 0.14M al 0.05% (v/v) con trietilamina (TEM) pH 6.8 ajustado con ácido acético glacial y metanol (90:10), y como fase B una solución de acetonitrilo-agua (60:40). El gradiente utilizado para la separación fue de 100% A a 25% A-75%B en 15 min, seguido un periodo isocrático de 5 min con una proporción de 25% A-75%B y finalmente 5 min de reacondicionamiento de la columna para llegar a la condición inicial, 100%A. La elución se realizó con una velocidad de flujo de 0.55 mL min⁻¹ y los derivados de Glu se detectaron a 335 nm.

Capítulo 4

La calibración se realizó por el método de estándar externo en un intervalo lineal de seis niveles de estándar de Glu derivatizado con OPA (anexo H)

4.3.5.2.1 Derivatización de Glu

La metodología para realizar la derivatización del Glu con OPA fue la siguiente:

1. Las muestras del medio de cultivo se centrifugaron a $20,000 \times g$ a 4°C durante 10 min.
2. Los sobrenadantes se diluyeron 20 veces en amortiguador de boratos 0.4 M, pH 10.5
3. $5\mu\text{L}$ de las muestras diluidas se mezclaron con $52.5\mu\text{L}$ de amortiguador de boratos 0.4M, pH 10.5 y $2.5\mu\text{L}$ de una solución concentrada de OPA. El volumen final de reacción fue $60\mu\text{L}$.
4. Las reacciones de derivatización se mantuvieron a 27°C durante 2 min con una velocidad de agitación de 600 rpm.
5. Finalmente, las muestras derivatizadas se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos.

4.3.5.2.2 Preparación de la solución de *o*-ftalaldehído (OPA)

La preparación de OPA se realizó según lo establecido por Thippeswamy *et al.*, [127]. Se pesaron 5 mg de OPA y se diluyeron en $50\mu\text{L}$ de metanol. Posteriormente, se agregaron $450\mu\text{L}$ de amortiguador de boratos 0.4M, pH 10.5 y se agitó la solución hasta que el OPA quedó completamente diluido. Una vez diluido el OPA, se adicionaron $25\mu\text{L}$ de β -mercaptoetanol (β -ME). La solución del agente derivatizante se preparó diariamente durante el transcurso del análisis.

4.3.6 Cuantificación de las fuentes de nitrógeno

Como fuentes de nitrógeno en los cultivos de *R. oryzae* ENHE, se utilizaron las moléculas de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y nitrato de sodio (NaNO_3). La concentración inicial de las sales nitrogenadas en el medio de cultivo fue de 2.5 g L^{-1} . Sin embargo, en términos de iones NH_4^+ y NO_3^- , corresponde a 0.681 g L^{-1} y 1.823 g L^{-1} , respectivamente. Los iones NH_4^+ y NO_3^- se cuantificaron por técnicas espectrofotométricas.

Antes de llevar a cabo la determinación de los iones nitrogenados, las muestras del medio de cultivo se centrifugaron a $12,000 \times g$ durante 10 min y se filtraron con membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de $0.22\mu\text{m}$.

4.3.6.1 Cuantificación de amonio (NH_4^+)

La determinación de amonio se realizó por la técnica del Fenato (4500-NH₃ F), también conocida como la técnica del azul de indofenol [128]. Las muestras de medio de cultivo se diluyeron 2000 veces en agua desionizada. 5 mL de las muestras diluidas se colocaron en tubos Hach y se adicionaron 200 μL de Fenol 1.1 M (disuelto en etanol), 200 μL de Nitroprusiato de sodio 17 mM y 500 μL de solución oxidante (recién preparada). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por 2h. Finalmente, se midió la absorbancia de las soluciones resultantes a 640 nm. La cuantificación de NH_4^+ se realizó por el método de estándar externo (anexo I).

- Reactivo alcalino: 100 g de citrato de sodio y 5 g de hidróxido de sodio disueltos en 500 mL de H₂O_d. Solución estable por un mes.
- Solución oxidante: 10 mL de reactivo alcalino con 3 mL de hipoclorito de sodio.

4.3.6.2 Cuantificación de nitratos (NO_3^-)

Para la cuantificación de NO_3^- se siguió la metodología descrita por Toledo-Cervantes *et al.*, [129]. Las muestras de medio de cultivo se diluyeron 250 veces en 2 mL de agua desionizada. A las muestras diluidas se les agregó 1 mL de HCl 1N y se mezclaron en un agitador Vórtex. Posteriormente, a las muestras, se les leyó su absorbancia a 220 nm. La cuantificación de NO_3^- se llevó a cabo por el método de estándar externo (anexo J)

4.4 Resultados

4.4.1 Efecto del PCF sobre la respiración de *R. oryzae* ENHE

En los cultivos de *R. oryzae* ENHE se estudió el efecto tóxico del PCF sobre la capacidad respiratoria del hongo. Como fuentes de carbono, se utilizaron al PCF y la Glc. El PCF se colocó en el medio de cultivo desde el comienzo de los experimentos respirométricos.

El gráfico 4.1 muestra la producción de CO₂ y el consumo de O₂ durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE con PCF como única fuente de carbono.

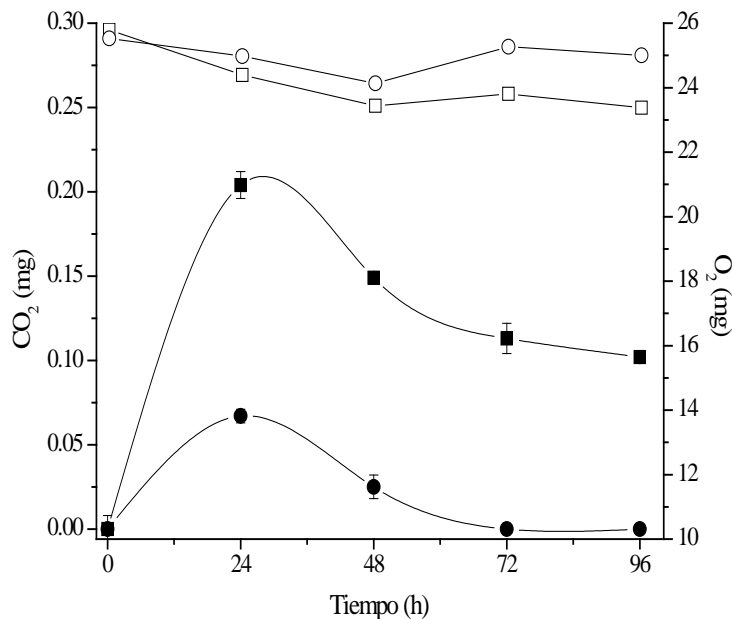


Gráfico 4.1 Cinética de producción de CO₂ y consumo de O₂ durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE con PCF como única fuente de carbono. (■, □) cultivos con 0.01 mg de PCF (1 mg L⁻¹); (●, ○) cultivos con 0.05 mg de PCF (5 mg L⁻¹); (■, ●) CO₂; (□, ○) O₂.

Al colocar PCF como fuente de carbono, las esporas de *R. oryzae* ENHE germinaron y formaron pequeñas ramificaciones de micelio. La mayor producción de CO₂ en los cultivos se cuantificó a las 24 h y fue en promedio de 0.20 ± 0.008 mg y 0.07 ± 0.004 mg de CO₂, para los cultivos con 0.01 mg y 0.05 mg de PCF, respectivamente. A las 24 h, *R. oryzae* ENHE consumió el 5.4% y 2.1% del O₂ disponible en los cultivos. Después de 24 h, el zigomiceto disminuyó su actividad respiratoria, y no consumió más O₂ ni produjo CO₂.

Con Glc, la actividad metabólica de *R. oryzae* ENHE fue mayor en comparación a la actividad metabólica con PCF como fuente de carbono. El gráfico 4.2 muestra el perfil respiratorio de *R. oryzae* ENHE en los cultivos con Glc y PCF.

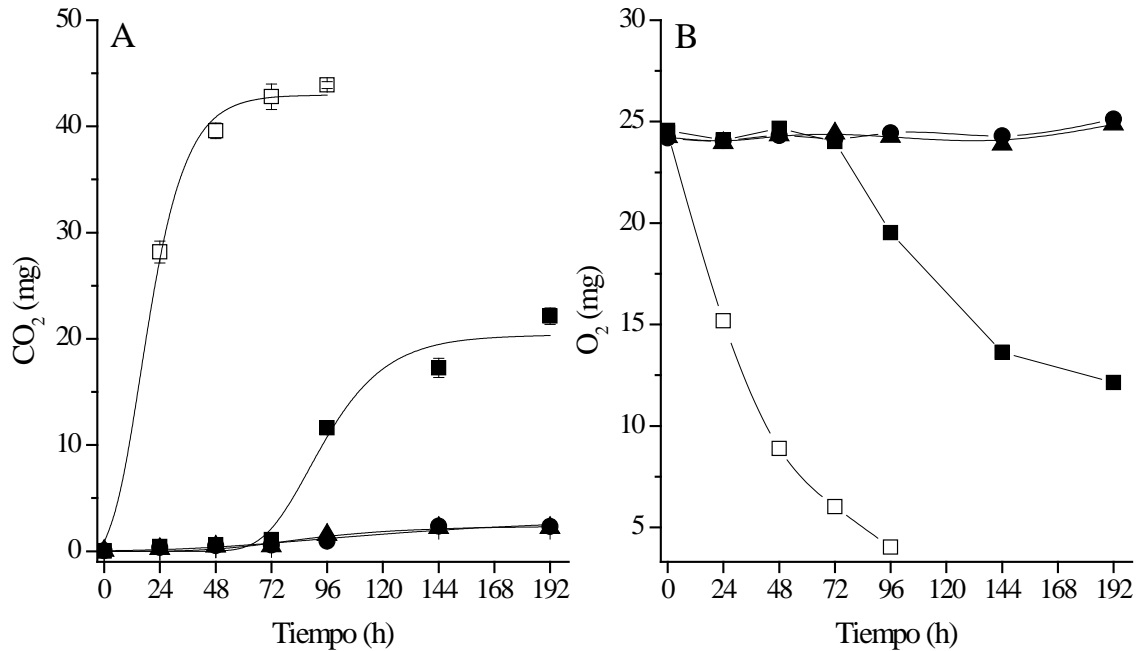


Gráfico 4.2 Producción de CO₂ y consumo de O₂ durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE con 5 g Glc L⁻¹ y PCF. (■) cultivos con 0.05 mg de PCF (5 mg L⁻¹); (●) cultivos con 0.08 mg de PCF (8 mg L⁻¹); (▲) cultivos con 0.125 mg de PCF (12.5 mg L⁻¹); (□) cultivos control, sin PCF.

Como se aprecia en el gráfico 4.2, el efecto tóxico del PCF causó disminución en la actividad metabólica de *R. oryzae* ENHE. En los controles, la máxima producción de CO₂ se alcanzó a las 72 h, y fue de 42.96 ± 0.90 mg. Mientras que en los cultivos con PCF, la mayor producción de CO₂ se alcanzó hasta las 196 h, y fue de 20.35 ± 1.39 mg, 3.05 ± 0.95 mg y 2.33 ± 0.25 mg para los cultivos con 0.05 mg, 0.08 mg y 0.125 mg de PCF, respectivamente (gráfico 4.2A).

En los cultivos control, *R. oryzae* ENHE consumió el 83.5% del O₂ disponible a una velocidad inicial de 0.42 mg O₂ h⁻¹. Mientras que en los cultivos con 0.05 mg de PCF, el hongo consumió el 50.6% del O₂ disponible a una velocidad inicial de 0.35 mg O₂ h⁻¹ después de las 72 h. En los cultivos con 0.08 mg y 0.125 mg de PCF, el hongo no consumió el O₂ disponible (gráfico 4.2B).

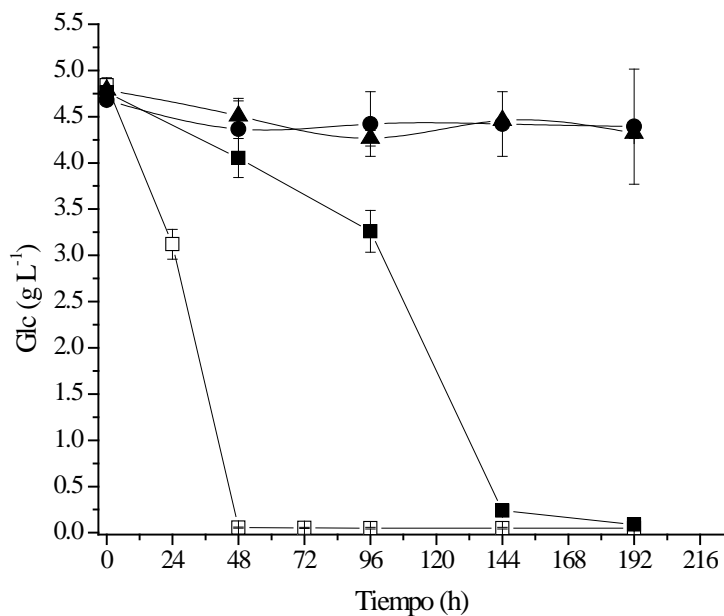


Gráfico 4.3 Consumo de Glc por *R. oryzae* ENHE durante los cultivos con 5g Glc L⁻¹ y PCF. Glc fue cuantificada en un analizador bioquímico YSI. (■) cultivos con 0.05 mg de PCF (5 mg L⁻¹); (●) cultivos con 0.08 mg de PCF (8 mg L⁻¹); (▲) cultivos con 0.125 mg de PCF (12.5 mg L⁻¹); (□) cultivos control, sin PCF.

Con lo que respecta al consumo de Glc por *R. oryzae* ENHE, en los cultivos control y con 0.05 mg de PCF se consumió el 99% de la Glc inicial en 48 y 196 h, respectivamente. En contraste, en los cultivos con 0.08 mg y 0.125 mg de PCF, *R. oryzae* ENHE sólo consumió en promedio el 8% de la Glc inicial (gráfico 4.3).

4.4.2 Pérdida abiótica de PCF

La pérdida abiótica del PCF se evaluó en 50 mL de medio de cultivo Lee 2X, sin inocular, con 2 mg de PCF. El gráfico 4.4 muestra la pérdida abiótica del PCF en el medio de cultivo.

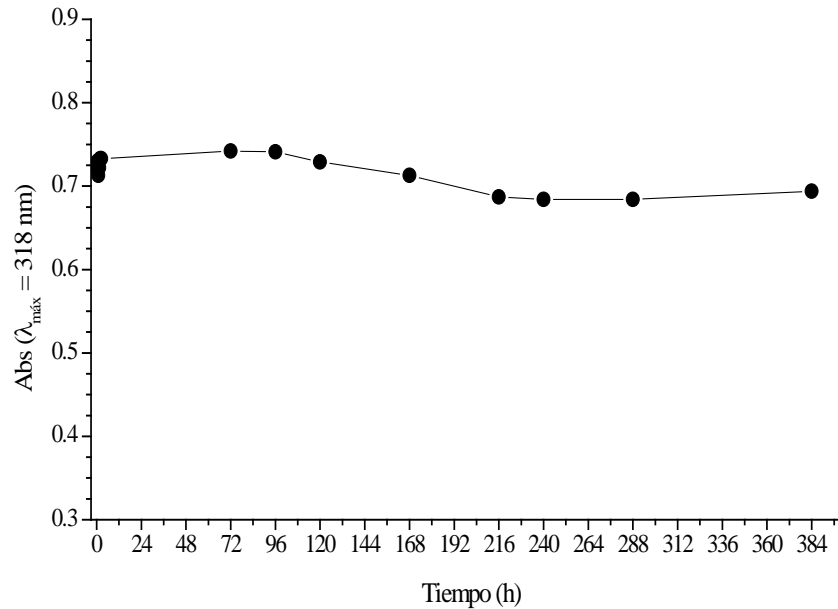


Gráfico 4.4 Cinética de eliminación abiótica de PCF en el medio Lee 2X

La concentración de PCF en el medio Lee 2X permaneció constante durante las primeras 120 h. A partir de la 120 h y hasta las 216 h, la concentración de PCF en el medio de cultivo disminuyó. De las 216 h en adelante, la concentración de PCF en el medio de cultivo no presentó un cambio significativo en la absorbancia del PCF (gráfico 4.4 y anexo K).

La cantidad de PCF cuantificada a las 216 h fue de 1.9 mg (37.9 mg PCF L⁻¹), lo cual revela una pérdida abiótica de 0.1 mg de PCF (2.1 mg PCF L⁻¹). Este valor fue considerado en los balances de masa realizados en los experimentos de biodegradación.

4.4.3 Efecto del PCF sobre el metabolismo de *R. oryzae* ENHE

Como se describió en la sección de materiales y métodos, se estudió la respuesta metabólica de *R. oryzae* ENHE al PCF en función de la composición del medio de cultivo y la cantidad inicial del PCF. Se propusieron ocho tratamientos para evaluar la respuesta metabólica de *R. oryzae* ENHE (figura 4.3).

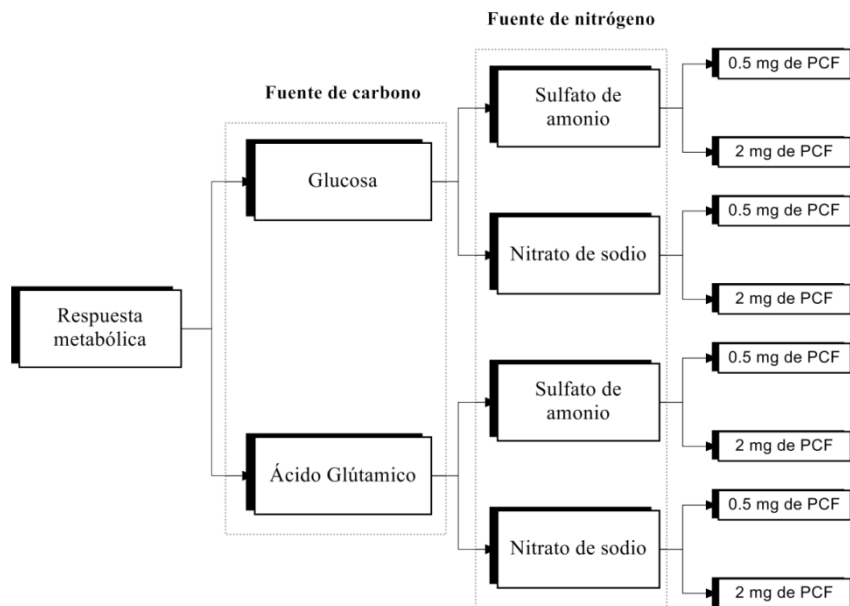


Figura 4.3 Esquema simplificado donde se muestran las condiciones experimentales que se realizaron para estudiar la respuesta metabólica de *R. oryzae* ENHE al PCF.

Sin embargo, en los cultivos con Glc- NaNO_3 , no todas las esporas de *R. oryzae* ENHE germinaron y formaron poco micelio; por lo que se descartó esa condición de cultivo. Otro caso similar fueron los cultivos con Glc- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en donde las esporas de *R. oryzae* ENHE germinaron muy lentamente. De hecho, a las 144 h, muy pocas esporas habían germinado. En ambos casos no fue posible cuantificar correctamente el crecimiento del hongo, ya que fue mínimo, por lo que se decidió no seguir los estudios con estos tratamientos.

La respuesta metabólica de *R. oryzae* ENHE al PCF se evaluó en cultivos con Glc- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Glc- NaNO_3 . A continuación se presentan los resultados obtenidos en los tratamientos.

4.4.3.1 Respuesta metabólica de *R. oryzae* ENHE al PCF utilizando Glc y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuentes de carbono y nitrógeno

El PCF, 0.5 y 2 mg, en los cultivos se adicionó a las 24 h, cuando ya habían germinado las esporas de *R. oryzae* ENHE y se había formado micelio. Paralelamente, se realizaron cultivos control libres de PCF.

La máxima producción de biomasa de *R. oryzae* ENHE con Glc-(NH₄)₂SO₄ se presentó a las 72 h, tanto en los cultivos control como en los cultivos con 0.5 mg de PCF (gráfico 4.5A). La biomasa producida con 0.5 mg de PCF no fue estadísticamente diferente a la producida en los cultivos control. El máximo crecimiento del hongo en los cultivos control fue de 1.12 ± 0.10 mg mL⁻¹. Mientras que en los cultivos con 0.5 mg de PCF el máximo crecimiento fue de 1.10 ± 0.03 mg mL⁻¹.

En contraste, en los cultivos con 2 mg de PCF, sí se notó el efecto del PCF sobre el crecimiento y metabolismo del hongo. El máximo crecimiento de *R. oryzae* ENHE se alcanzó en 24 h y fue de 0.475 ± 0.02 mg mL⁻¹ (gráfico 4.5A). Después de que se colocaron los 2 mg de PCF en los cultivos, el hongo dejó de crecer por el fuerte efecto tóxico del clorofenol [75]. Caso contrario a lo encontrado en los cultivos con 0.5 mg de PCF, donde *R. oryzae* ENHE siguió creciendo después de que se agregó el PCF al medio, por lo menos hasta las 72 h (gráfico 4.5A). La máxima producción de biomasa obtenida en los cultivos con 2 mg de PCF fue 2.3 veces inferior a la cuantificada en los tratamientos control y con 0.5 mg de PCF.

Con lo que respecta al consumo de Glc durante los experimentos de degradación, se observó que en los cultivos control la Glc fue consumida totalmente en las primeras 72 h (gráfico 4.5B). Lo cual explica porque después de 72 h no se observó más crecimiento de *R. oryzae* ENHE. En los cultivos con 0.5 mg de PCF, el perfil de consumo de Glc fue completamente distinto al encontrado en los controles. Después de que se adicionó el PCF, la Glc no fue asimilada por *R. oryzae* ENHE en las siguientes 48 h. Después de las 72 h, se observó un decremento en la Glc, indicando que el hongo la consumió lentamente, hasta el final del cultivo (gráfico 4.5B). A pesar de que el hongo siguió consumiendo Glc después de que se agregó el PCF al medio, el consumo de Glc no se vio reflejado en el crecimiento de *R. oryzae* ENHE. A las 72 h, donde se encontró el mayor crecimiento de *R. oryzae* ENHE en presencia de 0.5 mg de PCF, el hongo había consumido el 76.1% de la Glc inicial (gráfico 4.5B).

En los cultivos con 2 mg de PCF, el efecto tóxico del plaguicida se observó con mayor intensidad, ya que después de que se agregó el PCF a los cultivos, el crecimiento del hongo se detuvo por completo (gráfico 4.5B). También, el consumo de Glc se vio afectado puesto

Capítulo 4

que *R. oryzae* ENHE dejó de asimilar la Glc disponible en el medio de cultivo. El hongo consumió el 71% de la Glc a partir de las 24 h y no se observó consumo a partir de este momento y hasta el final del cultivo (gráfico 4.5B).

La asimilación de NH_4^+ en los cultivos de *R. oryzae* ENHE fue rápida. A las 72 h, el hongo había alcanzado su máximo consumo de NH_4^+ . En los cultivos control, el hongo consumió en promedio $132.1 \pm 11.1 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$. Mientras en los cultivos con 0.5 mg y 2 mg de PCF, *R. oryzae* ENHE consumió en promedio $97.2 \pm 4.4 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ y $92.5 \pm 3.5 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, respectivamente (gráfico 4.6). A las 72 h, el consumo de NH_4^+ fue del 19.4%, 14.8% y 14.7% en los cultivos control, con 0.5 mg y 2 mg de PCF, respectivamente. Después de las 72 h, la evaporación del agua del medio de cultivo (15 mL) impidió observar el consumo de NH_4^+ durante los cultivos.

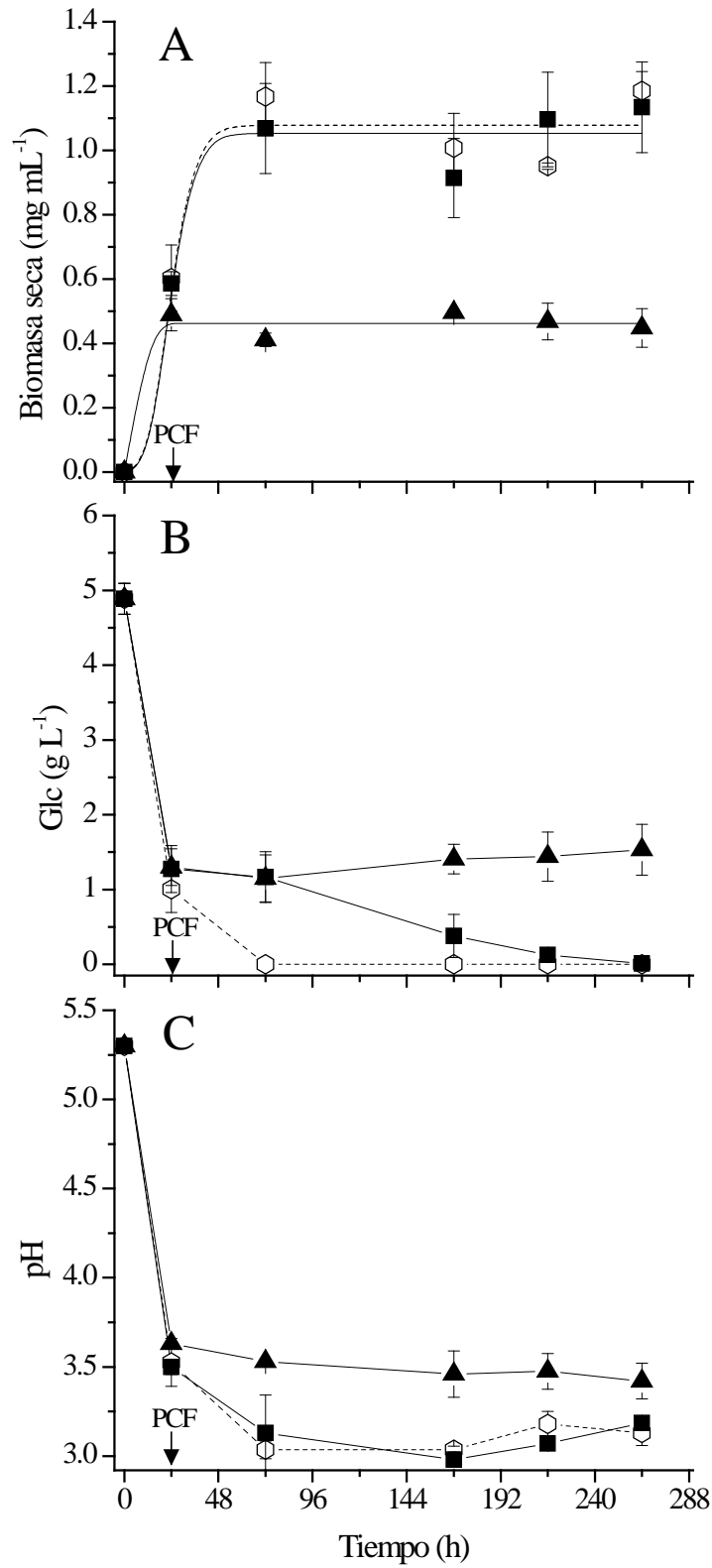


Gráfico 4.5 Cinéticas de crecimiento (A), consumo de Glc (B) y pH (C) durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE en medio Lee 2X con Glc-(NH₄)₂SO₄ y PCF. (○) Cultivos control; (■) con 0.5 mg de PCF; (▲) con 2 mg de PCF.

Capítulo 4

El rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) en los cultivo control y con 0.5 mg de PCF fue estadísticamente similar, 0.22 y 0.24 (tabla 4.1). Mientras, que en los cultivos con 2 mg de PCF el $Y_{x/s}$ fue 1.6 veces menor que el calculado en los cultivos control.

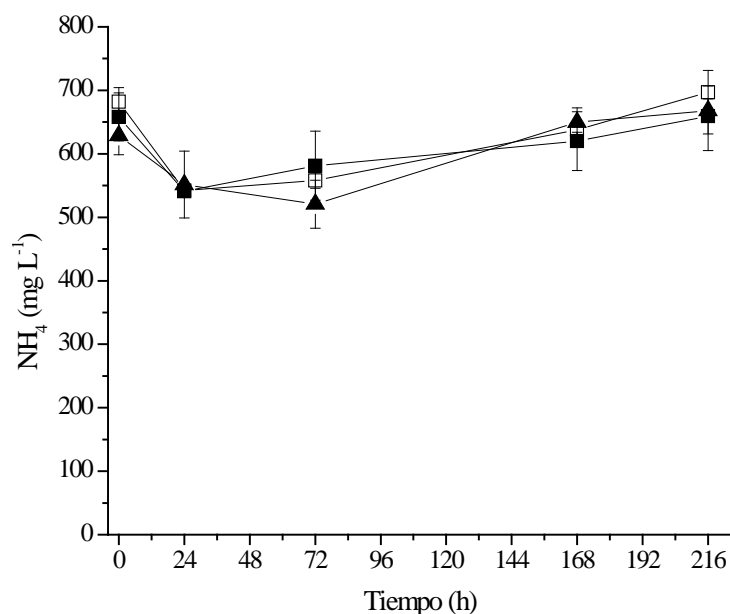


Gráfico 4.6 Perfil cinético de NH_4^+ durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE en presencia de PCF. (■) 0.5 mg de PCF; (▲) 2 mg de PCF; (□) control sin PCF.

Tabla 4.1 Parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *R. oryzae* ENHE en medio de cultivo Lee 2X con $\text{Glc}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Tratamiento	$Y_{x/s}$ (g Glc g ⁻¹ biomasa Seca)	μ (h ⁻¹)*	q_s (g Glc g ⁻¹ biomasa Seca h ⁻¹)
Control	0.22 ± 0.02	0.087	0.40 ± 0.04
0.5 mg de PCF	0.24 ± 0.04	0.051	0.22 ± 0.03
2 mg de PCF	0.14 ± 0.01	0.036	0.27 ± 0.03

*La velocidad de crecimiento específica, μ , fue calculada utilizando el modelo de Gomerz. En los tres tratamientos, el ajuste de los resultados experimentales con el modelo presentó $R^2 > 0.97$

Las velocidades de crecimiento específicas (μ) también se vieron afectadas por el efecto tóxico del PCF. A mayor cantidad de PCF, se observó menor valor de μ . En los cultivos con 0.5 mg de PCF se estimó una μ de 0.051 h⁻¹, mientras que en los cultivos con 2 mg de

PCF, el valor de μ fue 1.4 veces menor al encontrado en los cultivos con 0.5 mg de PCF (tabla 4.1). En los cultivos control se estimó una μ de 0.087 h^{-1} ; lo cual indica que la velocidad de crecimiento de *R. oryzae* ENHE sin PCF fue 1.7 y 2.4 veces superior a la velocidad de crecimiento encontrada en los cultivos con 0.5 y 2 mg de PCF, respectivamente (tabla 4.1).

Las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s) también se vieron afectadas por el PCF (tabla 4.1). En los controles, la q_s fue casi dos veces más grande que en los cultivos con PCF. En los cultivos con 0.5 mg de PCF, se estimó una q_s de $0.22 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ y en los cultivos con 2 mg de PCF, se encontró una q_s de $0.27 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$. En ambos tratamientos, las q_s estimadas no fueron estadísticamente diferentes entre sí. Lo que significa que la velocidad específica de consumo de Glc no se afecta por la cantidad inicial de PCF en el medio.

Durante el transcurso de los cultivos, el metabolismo de *R. oryzae* ENHE produjo ácidos orgánicos que disminuyeron el pH del medio de cultivo. En los cultivos control y con 0.5 mg de PCF, el pH disminuyó hasta un valor de 3.10 ± 0.07 , mientras que en los cultivos con 2 mg de PCF, el pH final fue de 3.5 ± 0.1 (gráfico 4.5C).

La diferencia de pH en los cultivos con 2 mg de PCF, con respecto al pH de los cultivos control y con 0.5 mg de PCF, se puede explicar por la baja producción de biomasa de *R. oryzae* ENHE obtenida con 2 mg de PCF.

4.4.3.1.1 Biodegradación de 0.5 mg de PCF

Después de adicionar 0.5 mg de PCF, la biomasa de *R. oryzae* ENHE removió el 96.6% del PCF inicial en menos de 10 min de contacto (gráfico 4.7). A partir de las 24 h, el PCF retenido por la biomasa fue liberándose gradualmente. Hasta que a las 168 h, se cuantificó la máxima cantidad de PCF en el medio de cultivo, 18.1% del PCF inicial. A partir de este momento, la cantidad de PCF en el medio permaneció sin cambio significativo (gráfico 4.7).

A pesar de la rápida remoción del PCF por la biomasa de *R. oryzae* ENHE, no se lograron identificar intermediarios de la degradación de PCF en el medio de cultivo, en ninguno de los tiempos de muestreo.

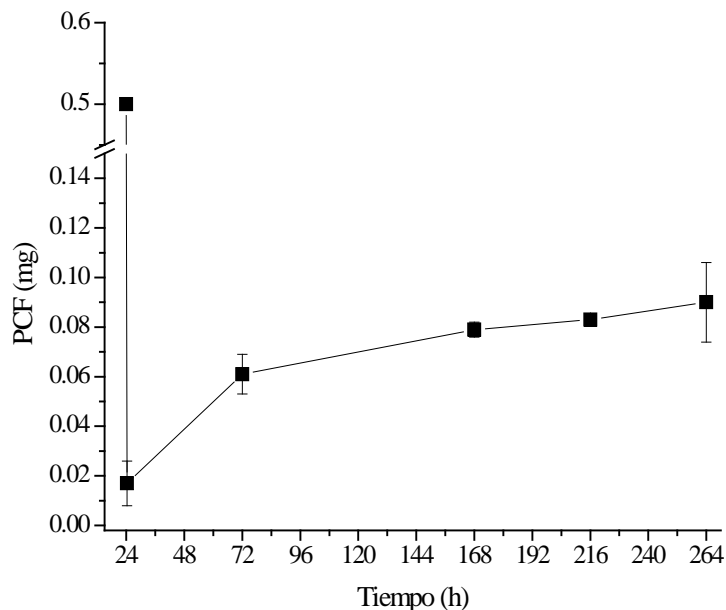


Gráfico 4.7 PCF cuantificado en el medio de cultivo durante la biodegradación de 0.5 mg de PCF en medio Lee 2X con Glc-(NH₄)₂SO₄.

En la biomasa de *R. oryzae* ENHE recuperada al final del cultivo, 264 h, se identificaron moléculas de PCF conjugadas con grupos metilo formando moléculas de pentaclorometóxibenceno (PCMB), también conocido como pentacloroanisol (PCA).

En la biomasa total producida en los cultivos con 0.5 mg de PCF, se cuantificó el 2.4% ($12.05 \pm 0.07 \mu\text{g}$) del PCF inicial. Además, se cuantificó en promedio $1.33 \pm 0.09 \mu\text{g}$ de PCA, lo cual equivale a un 0.3% de biodegradación por el mecanismo de conjugación. La pérdida abiótica fue 20%, por lo tanto no fue posible cuantificar el 59.2% del PCF inicial.

4.4.3.1.2 Biodegradación de 2 mg de PCF

En los cultivos con 2 mg de PCF se observó una sorción rápida del PCF por el micelio del zigomiceto. En menos de 10 min de contacto, la biomasa del hongo removió el 93.2% del PCF inicial. A partir de las 72 h, la biomasa retuvo 97.6% del PCF inicial (gráfico 4.8). Esta remoción de PCF fue 3.9 veces mayor en comparación a los experimentos con 0.5 mg de PCF (gráfico 4.8).

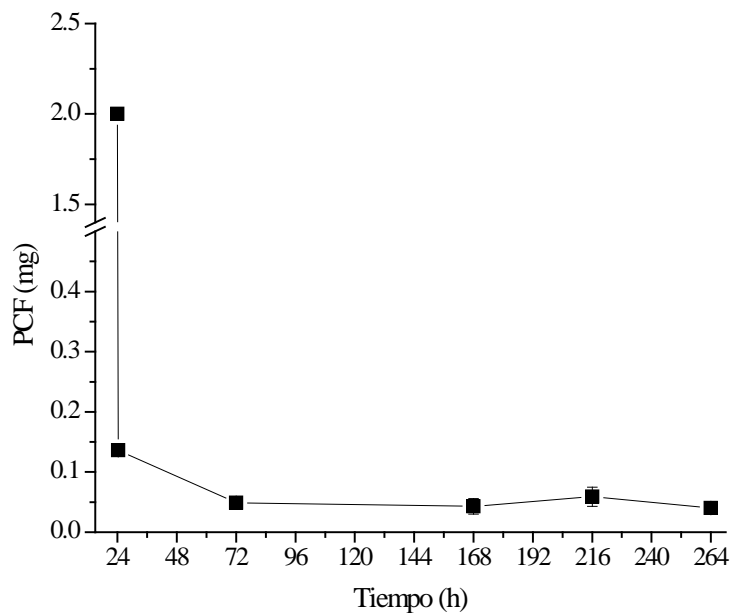


Gráfico 4.8 PCF cuantificado en el medio de cultivo durante la biodegradación de 2 mg de PCF en medio Lee 2X con $\text{Glc}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

En el medio de cultivo se identificaron las moléculas de tetraclorohidroquinona (TCHQ) y 3,4,5-triclorofenol (3,4,5-TCF). El gráfico 4.9 muestra los perfiles de aparición y desaparición de ambas moléculas cloradas con respecto al tiempo.

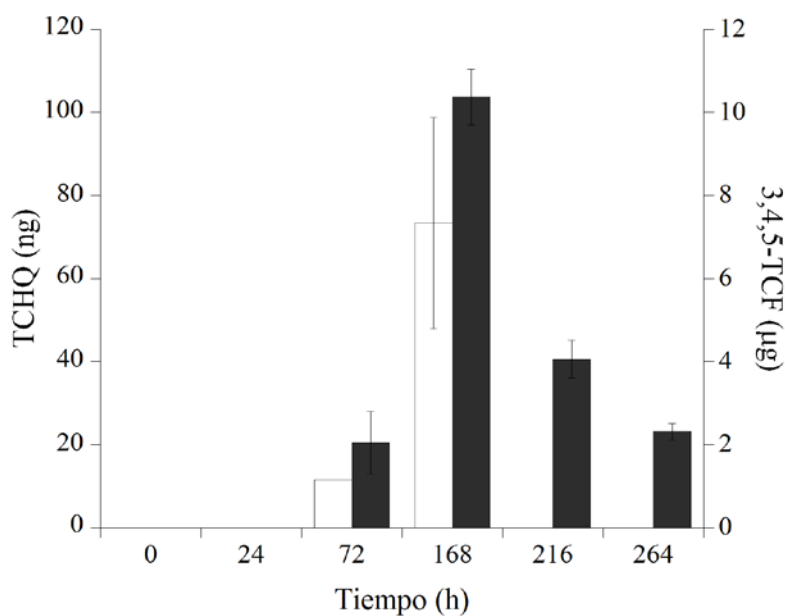


Gráfico 4.9 Intermediarios de la degradación de PCF cuantificados en las muestras de medio de cultivo. Medio de cultivo Lee 2X con Glc , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2 mg de PCF. (□) TCHQ y (■) 3,4,5-TCF

Capítulo 4

Como se observa en el gráfico 4.9, la aparición de TCHQ en el medio de cultivo comenzó a partir de las 72 h y fue de 11.60 ± 0.01 ng. A las 168 h, se cuantificaron 73.28 ± 25.46 ng. A partir de las 168 h, no se logró cuantificar más TCHQ en el medio.

Por su parte, la aparición de 3,4,5-TCF en el medio de cultivo también comenzó a partir de las 72 h y fue 2.05 ± 0.75 μ g (gráfico 4.9). Al igual que la TCHQ, la mayor cantidad de 3,4,5-TCF se encontró a las 168 h y fue 10.37 ± 0.67 μ g. A las 216 h, se cuantificaron 4.06 ± 0.46 μ g. Al final del cultivo, la cantidad de 3,4,5-TCF disminuyó a 2.31 ± 0.20 μ g.

Por otro lado, la biomasa producida en presencia de 2 mg de PCF y recuperada a las 264 h presentó gran actividad metabólica con respecto a la degradación de PCF (gráfico 4.10). Los cromatogramas de las muestras de biomasa mostraron la presencia de intermediarios de la degradación de PCF (tabla 4.2)

Tabla 4.2 Intermediarios de la degradación de PCF encontrados en la biomasa de *R. oryzae* ENHE con una edad de 264 h.

Nomenclatura	Compuesto	t _R (min)
A	3,4,5-TCF	5.79
B	Desconocido	6.11
C	Desconocido	6.31
D	Desconocido	6.80
E	TCHQ	7.24
F	Estándar interno (IS)	7.84
G	PCF	8.04
H	PCA	9.03
I	Desconocido	9.31

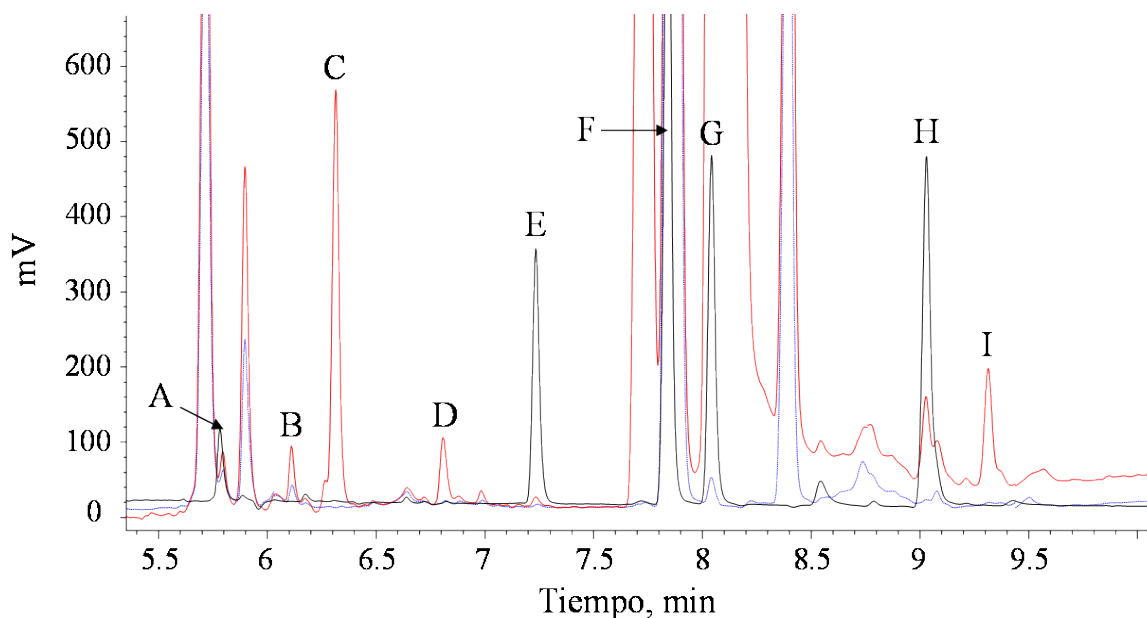


Gráfico 4.10 Cromatograma de los intermediarios de la degradación de PCF encontrados en la biomasa de *R. oryzae* ENHE producida con Glc, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2 mg de PCF. Biomasa con una edad de 264 h. (—) Biomasa de *R. oryzae* ENHE en presencia de PCF; (---) Biomasa de *R. oryzae* ENHE control, sin PCF; (—) Estándares.

Como se aprecia en el gráfico 4.10, los productos de la degradación de PCF no se observaron en la biomasa control. En la biomasa que estuvo expuesta al PCF, se separaron claramente siete compuestos halogenados. Dos de esos compuestos fueron 20.5 ± 5.6 ng de TCHQ (letra E) y 116.4 ± 34.3 ng de PCA (letra H).

Los cuatro picos restantes separados en la biomasa con PCF no pudieron ser identificados debido a la falta de estándares. Sin embargo, es altamente probable que los picos marcados con las letras B ($t_R = 6.11$ min), C ($t_R = 6.31$ min), D ($t_R = 6.80$ min) e I ($t_R = 9.31$ min) sean intermediarios de la degradación de PCF. Puesto que, en este trabajo de investigación, la detección de los compuestos clorados se realizó con un detector de captura de electrones (ECD), específico para la detección de compuestos con halógenos. Si los compuestos marcados con las letras B, C, D e I no presentaran cloros en su estructura, no se hubiera observado una señal analítica representada en los cromatogramas.

Para identificar los intermediarios de degradación de PCF que no fueron identificados por GC-ECD, las muestras de biomasa se analizaron por GC acoplado a un espectrómetro de masas (GC-EI-qMS). A partir de este análisis, se identificaron parcialmente dos

metabolitos clorados formados por el metabolismo de *R. oryzae* ENHE. El gráfico 4.11 muestra el cromatograma obtenido por conteo total de iones (TIC, acrónimo en inglés) de las muestras de biomasa de *R. oryzae* ENHE que estuvieron en contacto con 2 mg de PCF.

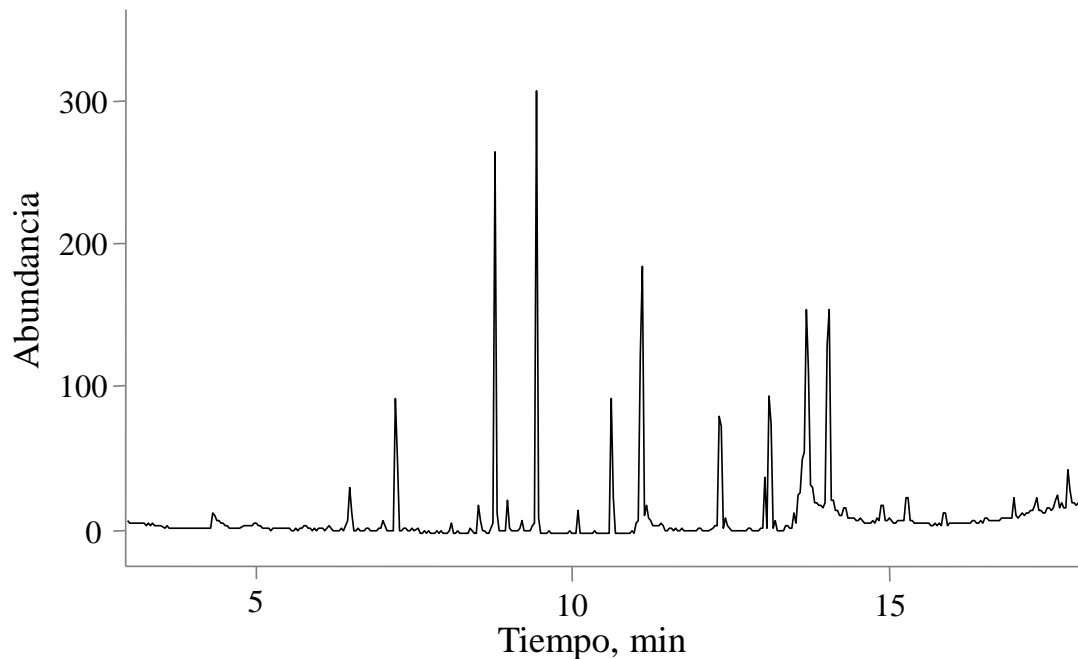


Gráfico 4.11 Cromatograma obtenido por TIC en GC-EI-qMS de la biomasa de *R. oryzae* ENHE producida con Glc, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2 mg de PCF.

El primer intermediario de la degradación de PCF identificado por GC-EI-MS presentó un t_R de 7.42 min y fue referido como 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TCF) en su forma acetilada. La figura 4.4 muestra la posible estructura generada de la fragmentación de la molécula de 2,3,4,6-TCF por el método de ionización por impacto de electrones. El espectro de masas obtenido del 2,3,4,6-TCF se muestra en el gráfico 4.12.

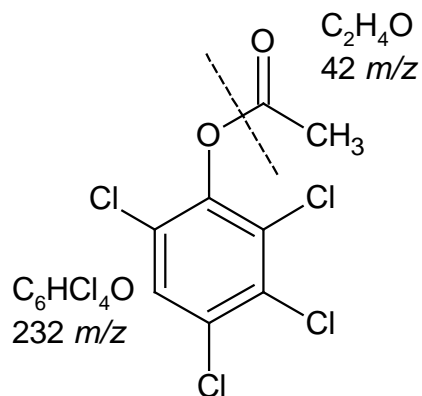


Figura 4.4 Fragmentación del 2,3,4,6-tetraclorofenol.

En el espectro de masas del 2,3,4,6-TCF (gráfico 4.12), se observa un ion molecular con una m/z de 274 correspondiente a la masa molecular del acetil derivado del 2,3,4,6-TCF, cuya fórmula molecular es C₈H₄Cl₄O₂. También, se observa una m/z de 232, que coincide con la masa del ion de 2,3,4,6-TCF sin acetilar.

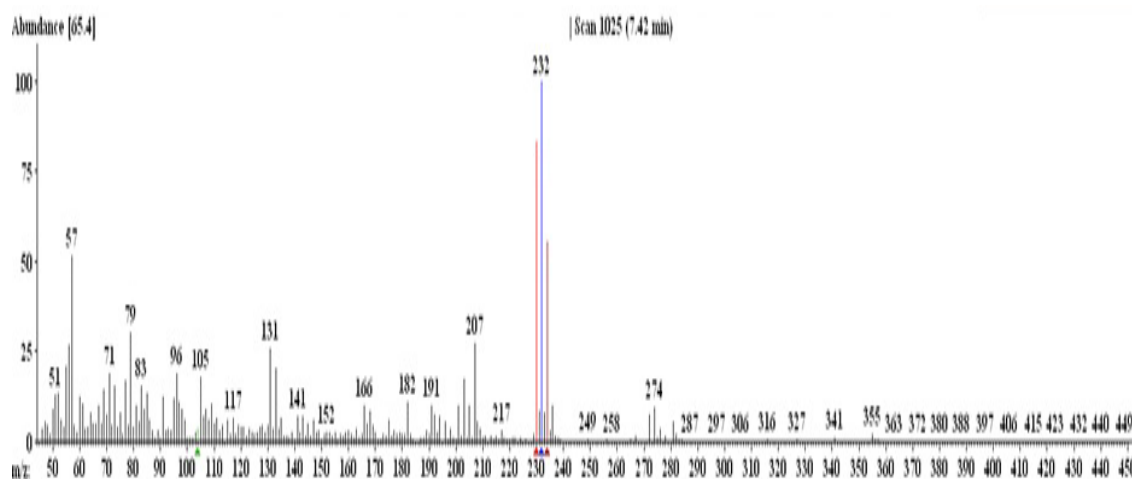


Gráfico 4.12 Espectro de masas del derivado acetilado de 2,3,4,6-TCF. Abundancia relativa del 65%.

El segundo metabolito de la degradación de PCF parcialmente identificado por espectrometría de masas presentó un t_R de 10.07 min (gráfico 4.13A). Del espectro de masas generado durante el análisis de este compuesto, se encontró un ion molecular con una m/z de 338 (gráfico 4.13B), que posiblemente pertenezca a una molécula de

pentaclorofenil 2-hidroxiopropionato (lactato de PCF), cuya fórmula molecular se representaría como $C_9H_5Cl_5O_3$. El ion principal detectado en el espectro de masas del gráfico 4.13B, fue el ion con una m/z de 323, el cual puede corresponder a la fórmula molecular representada como $C_8H_3Cl_5O_3$. La figura 4.5 muestra la posible estructura generada durante la fragmentación de la molécula del lactato de PCF por el método de EI.

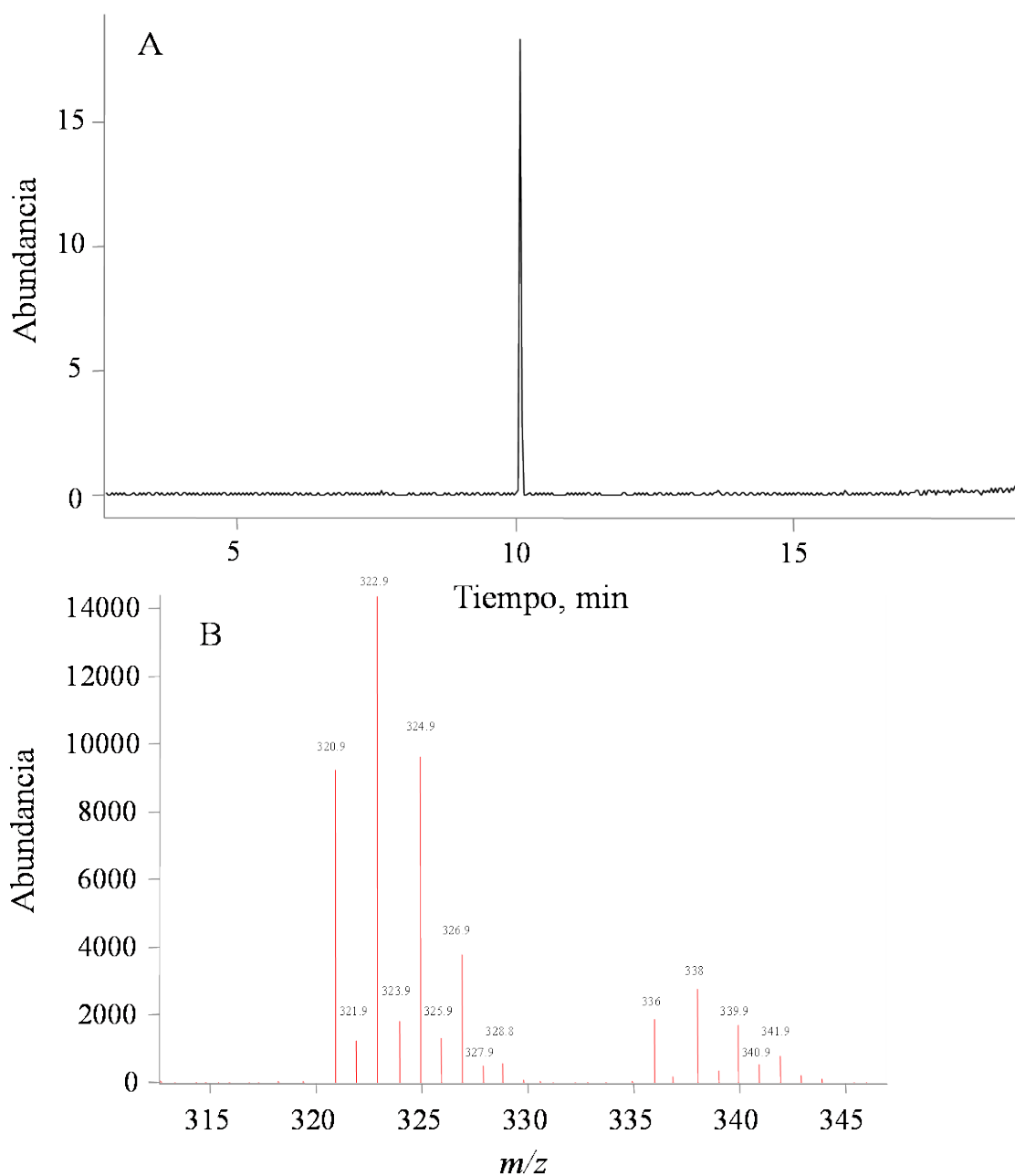


Gráfico 4.13 Cromatograma GC-EI-qMS obtenido del segundo intermediario de la degradación de PCF encontrado en la biomasa de *R. oryzae* ENHE, con una m/z de 323 (A). Espectro de masas del compuesto anterior (B).

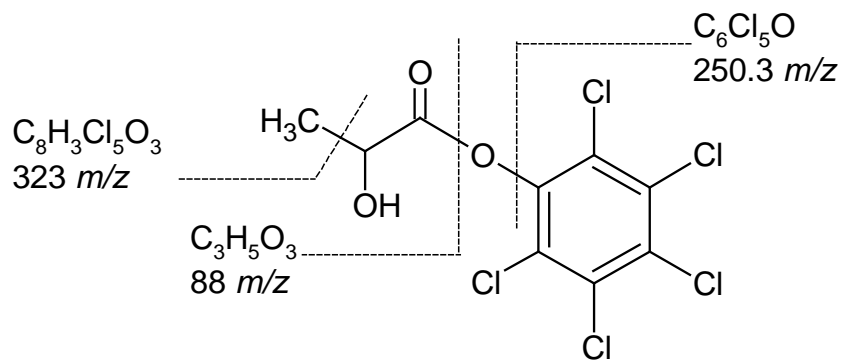


Figura 4.5 Fragmentación de pentaclorofenil 2-hidroxiopropionato (lactato de PCF).

Considerando al PCF y los intermediarios cuantificados en el medio y la biomasa, *R. oryzae* ENHE degradó el 0.53% del PCF inicial (solo el 0.006% del PCF fue PCA). El 2.4% y 1.7% del PCF inicial fueron cuantificados en el medio de cultivo y en la biomasa, respectivamente. El 5% del PCF inicial se perdió por factores abióticos, mientras que 90.3% del PCF inicial no fue cuantificado en ninguno de los extractos analizados.

4.4.3.2 Respuesta metabólica de *R. oryzae* ENHE al PCF utilizando Glu y $NaNO_3$ como fuentes de carbono y nitrógeno.

R. oryzae ENHE creció utilizando como fuente de carbono al Glu. Sin embargo, el crecimiento fue lento, por lo que el PCF se adicionó a las 144 h. Simultáneamente, se realizaron cultivos control sin PCF.

En los cultivos control, el máximo crecimiento de *R. oryzae* ENHE fue a las 196 h y fue 2.485 ± 0.08 mg L⁻¹ (gráfico 4.14A). En los cultivos con 0.5 mg de PCF, el máximo crecimiento se alcanzó hasta las 288 h y fue 2.291 ± 0.09 mg L⁻¹ (gráfico 4.14A). Mientras que en los cultivos con 2 mg de PCF, el hongo dejó de crecer después de que se adicionó el PCF; el crecimiento máximo fue 1.147 ± 0.04 mg L⁻¹ (gráfico 4.14A).

En los experimentos con 0.5 mg de PCF, el crecimiento máximo del hongo disminuyó 1.08 veces después de su adición en comparación a los cultivos control. A pesar de esto, el hongo continuó creciendo hasta las 196 h. En los cultivos con 2 mg de PCF, el hongo no creció más al adicionar el PCF, por lo que su crecimiento máximo fue 2.17 veces menor en comparación a los cultivos control (gráfico 4.14A)

Capítulo 4

Antes de la adición del PCF, *R. oryzae* ENHE consumió $56 \pm 4.3\%$ del Glu inicial. Posteriormente, el consumo del Glu estuvo en función de la concentración de PCF adicionado (gráfico 4.14B).

En los cultivos control, *R. oryzae* ENHE consumió totalmente el Glu a las 288 h. A las 196 h, donde se encontró el máximo crecimiento, el hongo consumió el $68.6 \pm 4.2\%$ del Glu (Gráfico 4.14B). En los cultivos con 0.5 mg de PCF, el hongo no logró consumir completamente el Glu. El máximo consumo fue a las 388 h y fue de $95.6 \pm 0.53\%$ del Glu inicial. A las 288 h, donde se observó el máximo crecimiento con 0.5 mg de PCF, *R. oryzae* ENHE consumió 82.9% del Glu inicial (gráfico 4.14B). Mientras que en los cultivos con 2 mg de PCF, el hongo sólo consumió el $72.3 \pm 2.6\%$ del Glu inicial a las 288 h (gráfico 4.14B).

La máxima producción de biomasa se alcanzó con un poco más del 50% del Glu consumido. El hongo utilizó el Glu restante para mantener su maquinaria celular activa (gráfico 4.14B).

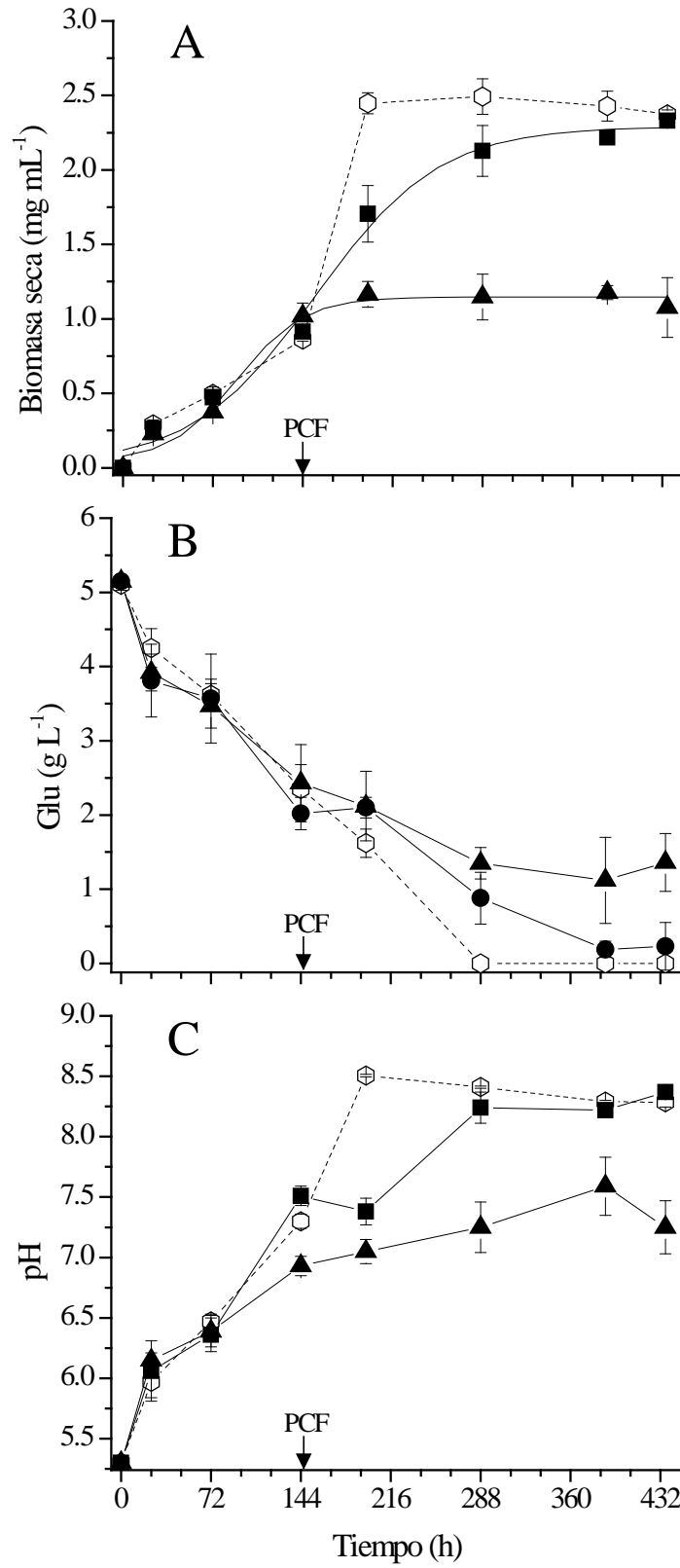


Gráfico 4.14 Cinéticas de crecimiento (A), consumo de Glu (B) y pH (C) durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE en medio Lee 2X con Glu-NaNO₃ y PCF. (○) Cultivos control; (■) con 0.5 mg de PCF; (▲) con 2 mg de PCF.

A pesar del gran crecimiento de *R. oryzae* ENHE, no fue posible observar consumo de NO_3^- . La pérdida de agua (15 mL) del medio de cultivo durante el periodo de incubación produjo un incremento en la concentración del NO_3^- (gráfico 4.15). No se descarta la posibilidad de que *R. oryzae* ENHE pueda utilizar NO_3^- como fuente de nitrógeno (debido a que en los cultivos con Glc y NaNO_3 se observó la germinación de esporas y poco crecimiento). Sin embargo, es posible que *R. oryzae* ENHE, en medio con Glu, haya utilizado una fuente de carbono orgánica más fácilmente metabolizable para su crecimiento, por ejemplo: el NH_4^+ liberado durante la des-aminación del Glu.

Debido a la des-aminación del Glu durante el cultivo, los perfiles de pH fueron opuestos a los encontrados en los cultivos con $\text{Glc}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De hecho, en los cultivos con $\text{Glu}-\text{NaNO}_3$ el pH incrementó con respecto al tiempo. Cuando el zigomiceto alcanzó su máximo crecimiento, el pH fue de 8.27 ± 0.08 en los cultivos control y con 0.5 mg de PCF. Mientras que en los cultivos con 2 mg de PCF el pH fue 7.28 ± 0.22 (gráfico 4.14C).

Es posible que en los cultivos con 2 mg de PCF no se haya alcanzado un pH tan alcalino como en los cultivos control y con 0.5 mg de PCF debido al poco crecimiento.

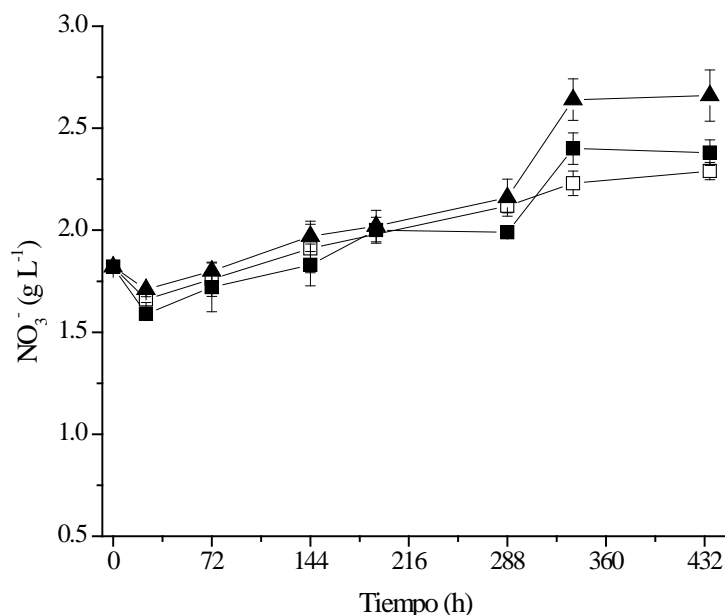


Gráfico 4.15 Perfil cinético de NO_3^- durante los cultivos de *R. oryzae* ENHE en presencia de PCF. (■) 0.5 mg de PCF; (▲) 2 mg de PCF; (□) control sin PCF.

En la tabla 4.3, se muestran los rendimientos de biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) calculados en los cultivos de *R. oryzae* ENHE con Glu- NaNO_3 . El $Y_{x/s}$ calculado en los cultivos control fue de 0.48 ± 0.012 y con 0.5 mg de PCF fue de 0.47 ± 0.026 , ambos $Y_{x/s}$ no fueron estadísticamente diferentes. El $Y_{x/s}$ en los cultivos con 2 mg de PCF fue 0.29 ± 0.009 , es decir 1.6 veces menor al calculado en los cultivos control.

El PCF afectó la velocidad específica de crecimiento (μ) (gráfico 4.14A). A mayor concentración de PCF el crecimiento del hongo fue menor y también la velocidad de crecimiento (tabla 4.3). En los cultivos con 0.5 mg de PCF, la μ fue de 0.011 h^{-1} . Mientras que en los cultivos con 2 mg de PCF, la μ fue de 0.009 h^{-1} . La μ en los cultivos con 0.5 y 2 mg fue 2.7 y 3.3 menor que la obtenida en los cultivos control (tabla 4.3).

Al contrario de lo encontrado en los cultivos con Glc, las velocidades específicas de consumo de sustrato (q_s) obtenidas en los experimentos de degradación con Glu, fueron afectadas por la cantidad de PCF (tabla 4.3). En los cultivos con 0.5 y 2 mg de PCF las q_s fueron 0.02 ± 0.001 y 0.03 ± 0.001 , respectivamente. Los cultivos control fueron los que presentaron la mayor q_s con un valor de 0.07 ± 0.001 .

Tabla 4.3 Parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *R. oryzae* ENHE en medio de cultivo Lee 2X con Glu- NaNO_3 como fuentes de carbono y nitrógeno.

Tratamiento	$Y_{x/s}$ (g Glu g ⁻¹ biomasa Seca)	μ (h ⁻¹)	q_s (g Glu g ⁻¹ biomasa Seca h ⁻¹)
Control	0.48 ± 0.012	0.030	0.07 ± 0.001
0.5 mg de PCF	0.47 ± 0.026	0.011	0.02 ± 0.001
2 mg de PCF	0.29 ± 0.009	0.009	0.03 ± 0.001

La velocidad de crecimiento específica, μ , fue calculada utilizando el modelo de Gompertz*. En los tres tratamientos, el ajuste de los resultados experimentales con los modelos presentaron $R^2 > 0.98$.

4.4.3.2.1 Biodegradación de 0.5 mg de PCF

En los cultivos con Glu- NaNO_3 , la biomasa de *R. oryzae* ENHE sorbió el 84.9% del PCF inicial en los primeros 10 min de contacto. El PCF sorbido por el micelio permaneció en él hasta el final del cultivo. Sólo se cuantificaron 0.071 ± 0.004 mg de PCF en el medio de cultivo (gráfico 4.16). En ningunas de las muestras del medio de cultivo analizadas se identificaron intermediarios de la degradación de PCF.

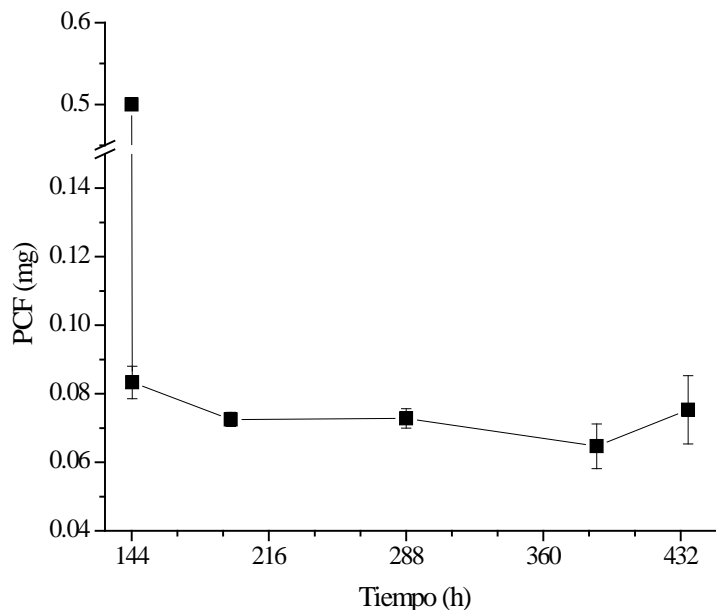


Gráfico 4.16 PCF cuantificado en el medio de cultivo durante la biodegradación de 0.5 mg de PCF en medio Lee 2X con Glu- NaNO_3 .

En la biomasa de *R. oryzae* ENHE recuperada al final de los cultivo, 436 h, se identificaron tres metabolitos relacionados con la degradación de PCF, los cuales fueron TCHQ, 3,4,5-TCF y PCA. En gráfico 4.17 se observa la presencia de estos intermediarios. Tomando en cuenta la biomasa total producida durante el cultivo se cuantificaron $0.235 \pm 0.068 \mu\text{g}$, $5.941 \pm 0.093 \mu\text{g}$, y $3.833 \pm 0.075 \mu\text{g}$ de TCHQ, 3,4,5-TCF y PCA, respectivamente.

R. oryzae ENHE al metabolizar Glu degradó el 2% del PCF inicial. El 1.2% de las moléculas de PCF fueron degradadas a moléculas con menor número de átomos de cloro en su estructura. Mientras que el 0.8% de las moléculas de PCF fueron conjugadas con grupos metilo formando PCA. 15.1% y 6.9% del PCF inicial se cuantificaron en el medio de cultivo y la biomasa, respectivamente. 20% del PCF inicial fue removido por factores abióticos y 56% del PCF inicial no fue cuantificado en los cultivos de *R. oryzae* ENHE.

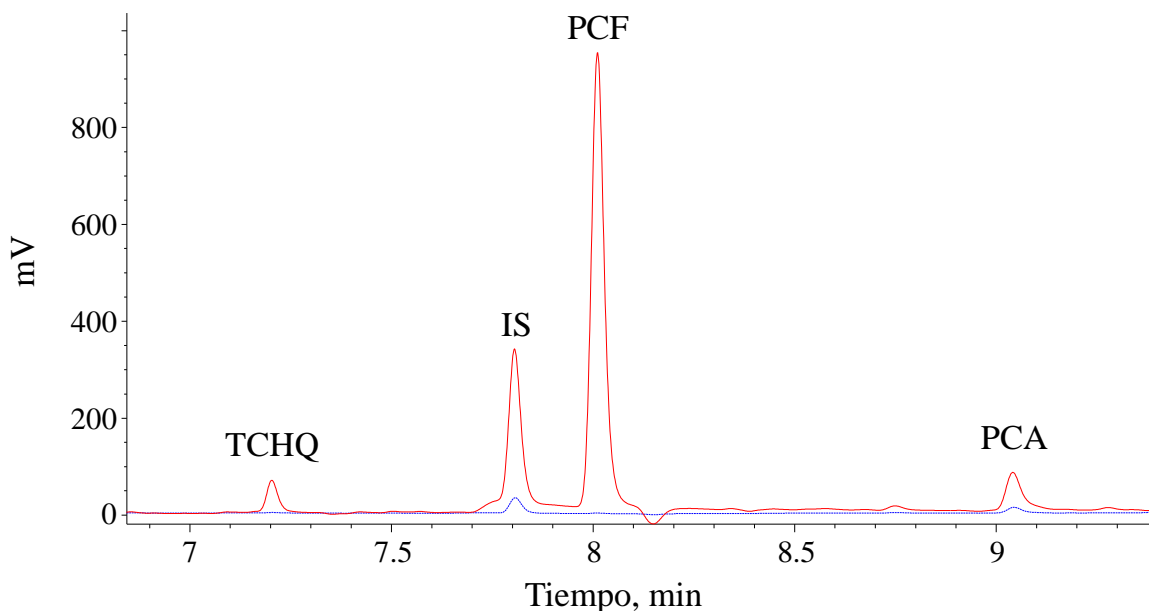


Gráfico 4.17 Cromatograma obtenido de la biomasa de *R. oryzae* ENHE producida con Glu, NaNO₃ y 0.5 mg de PCF. Biomasa con una edad de 436 h. (—) Biomasa que estuvo en contacto con PCF; (---) biomasa control sin PCF.

4.4.3.2.2 Biodegradación de 2 mg de PCF

El hongo sorbió el 95.5% del PCF inicial en menos de 10 min, por lo que en el medio de cultivo se detectaron solamente 0.10 ± 0.01 mg de PCF durante todo el cultivo (gráfico 4.18).

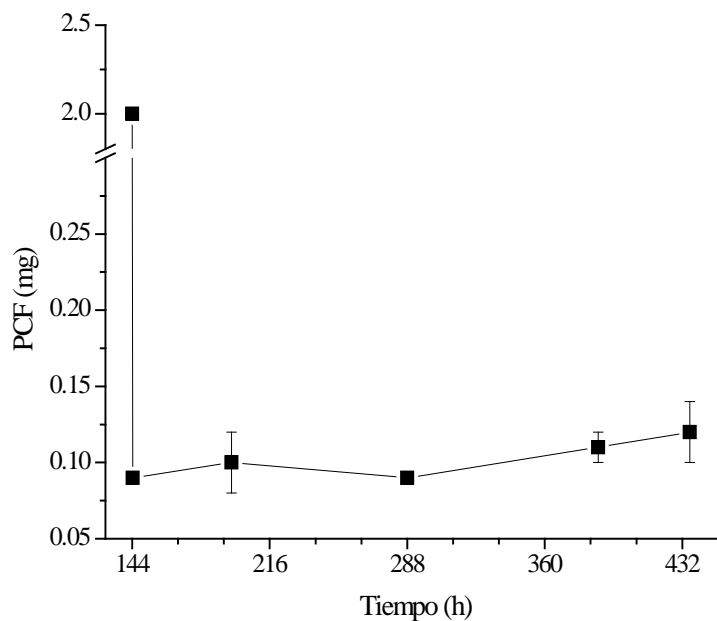


Gráfico 4.18 PCF cuantificado en el medio a diferentes tiempos de cultivo de *R. oryzae* ENHE en medio con Glu, NaNO₃ y 2 mg de PCF.

Capítulo 4

Parte del PCF sorbido por la biomasa de *R. oryzae* ENHE fue metabolizado a PCA y se cuantificó en el medio de cultivo (gráfico 4.19).

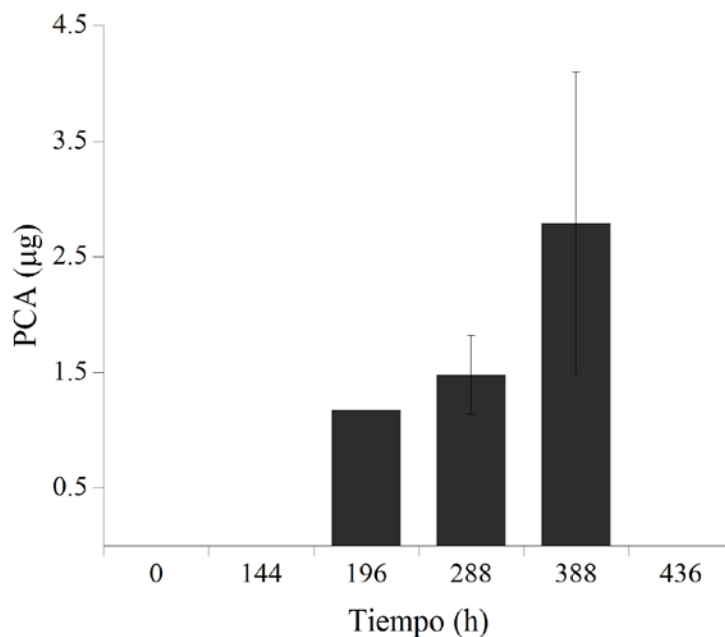


Gráfico 4.19 PCA cuantificados en el medio de cultivo con respecto al tiempo en los cultivos con Glu, NaNO_3 y 2 mg de PCF.

La aparición del PCA en el medio de cultivo se observó a partir de las 196 h y fue de $1.17 \pm 0.01 \mu\text{g}$. El PCA en el medio de cultivo incrementó 1.3 veces a las 288 h. A las 388 h, el PCA fue $2.8 \pm 1.31 \mu\text{g}$. Finalmente, a las 436 h, ya no se detectó PCA en el medio de cultivo.

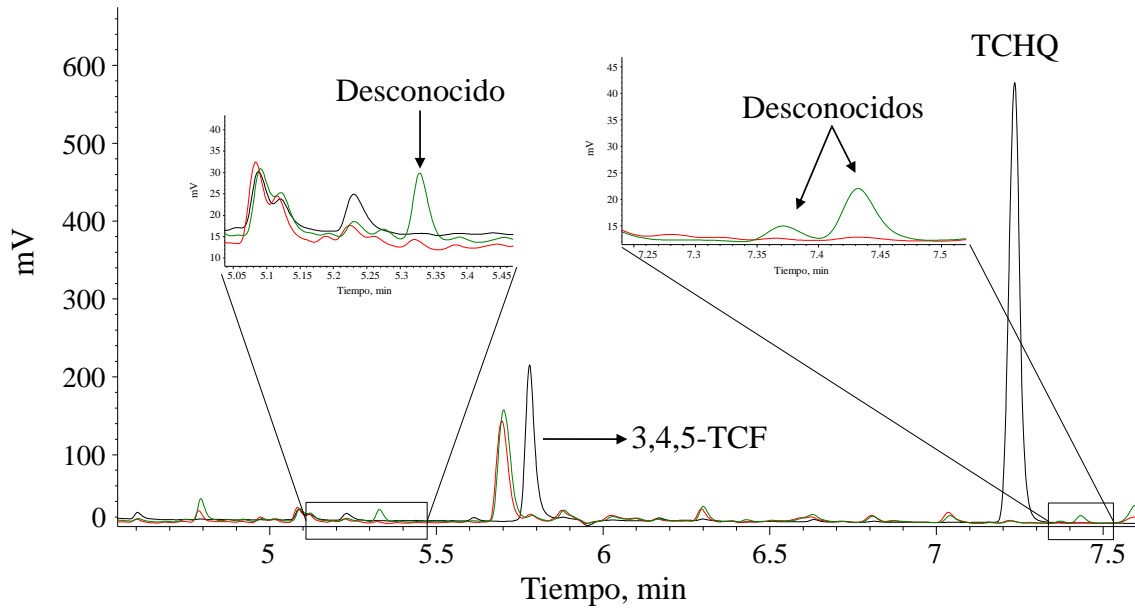


Gráfico 4.20 Cromatograma obtenido del medio de cultivo con Glu, NaNO_3 y 2 mg de PCF. (—) medio de cultivo de 144 h, sin PCF; (—) medio de cultivo de 388 h en presencia de PCF; (—) estándares.

Sin embargo, el PCA no fue el único intermediario de la degradación de PCF que fue encontrado en el medio de cultivo. En gráfico 4.20 se observan tres intermediarios de la degradación de PCF que no se pudieron identificar. Estos posibles intermediarios involucrados en la degradación del PCF presentaron un t_R de 5.43, 7.37 y 7.43 min. La mayor presencia de estos intermediarios en el medio de cultivo se observó a las 388 h. No obstante, la presencia de estos intermediarios se encontró desde las 196 h y hasta el final del cultivo.

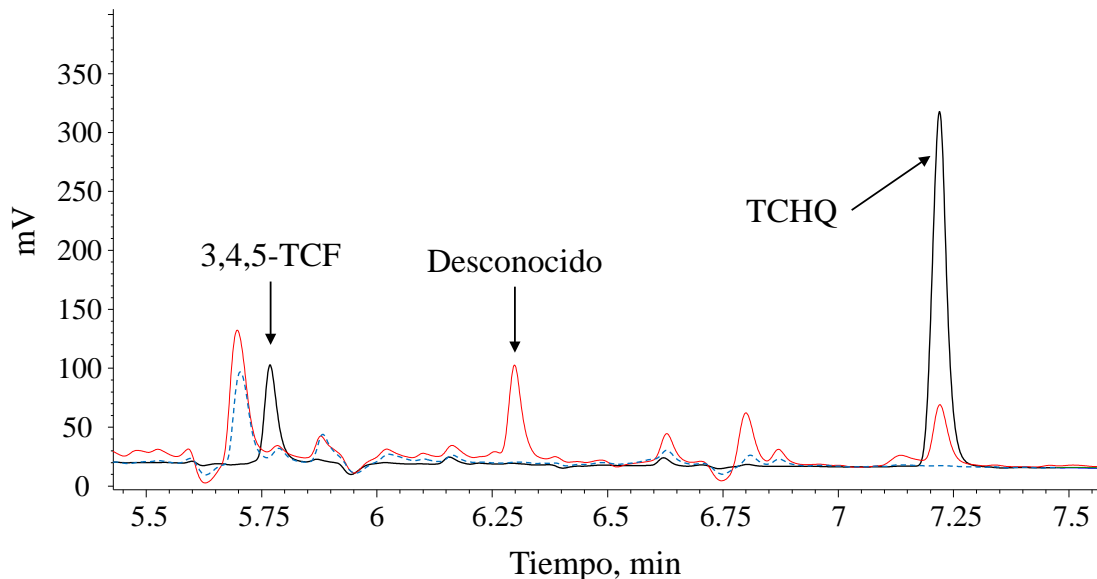


Gráfico 4.21 Cromatograma obtenido de la biomasa de *R. oryzae* ENHE producida con Glu, NaNO₃ y 2 mg de PCF. Biomasa con una edad de 436 h. (—) Biomasa que estuvo en contacto con PCF; (---) Biomasa control sin PCF; (—) estándares. A: 3,4,5-TCF; B: Desconocido; C: TCHQ.

En la biomasa recuperada a las 436 h se cuantificaron $35.718 \pm 0.25 \mu\text{g}$, $0.152 \pm 0.08 \mu\text{g}$, $2.738 \pm 0.907 \mu\text{g}$ y $4.017 \pm 0.189 \mu\text{g}$ de PCF, TCHQ, 3,4,5-TCF y PCA, respectivamente. El 0.20% de PCF inicial fue *o*-metilado a PCA, mientras que el 0.14% fue degradado a moléculas con menor número de cloros en su estructura. Se encontró otro posible intermediario de la degradación de PCF, que no pudo ser identificado, con un t_R de 6.30 min (gráfico 4.21). Este compuesto clorado difiere en t_R a los posibles intermediarios no identificados separados en el medio de cultivo.

En términos generales y considerando los intermediarios identificados, *R. oryzae* ENHE degradó el 0.48% del PCF inicial. Se perdió el 5% del PCF por factores no biológicos y se cuantificó el 5.45% del PCF inicial. No se encontró el 89.1% del PCF inicial.

4.5 Discusión

En este trabajo de investigación se encontró que la remoción del PCF está estrechamente ligada a las fuentes de carbono utilizadas en los cultivos de *R. oryzae* ENHE. Las fuentes de carbono determinan el crecimiento, la velocidad de crecimiento, la velocidad de consumo de los nutrientes y el tipo de mecanismo metabólico que *R. oryzae* ENHE utilizará para

mitigar el efecto tóxico del PCF. En general, a mayor concentración de PCF en el medio de cultivo: la respiración, el crecimiento del hongo, el rendimiento biomasa-sustrato, la velocidad específica de crecimiento y el consumo de las fuentes de carbono disminuyeron con respecto al control sin PCF.

Los estudios de respirometría indican que las esporas de *R. oryzae* ENHE germinaron, formaron pequeñas ramificaciones de micelio y respiraron en presencia de 0.01 y 0.05 mg de PCF (1 y 5 mg PCF L⁻¹), como única fuente de carbono. Lo que demuestra que por lo menos con cantidades de PCF menores o igual a 0.05 mg no se inhibe la germinación de esporas y presentan crecimiento. Resultados similares fueron reportados por Carvalho *et al.*, [75] en la biodegradación de PCF con *M. plumbeus* Bonord (DSM 16513).

Anteriormente, Mileski *et al.*, [50] demostraron que concentraciones de PCF iguales o superiores a 4 mg L⁻¹ inhibieron completamente la germinación de esporas del basidiomiceto *P. chrysosporium* en cultivo líquido con limitación de nitrógeno, pero con fuente de carbono (glucosa). En el caso de *R. oryzae* ENHE, cuando el PCF se adicionó al inicio de los cultivos en medio con Glc y concentraciones entre 5 y 12.5 mg PCF L⁻¹ (0.05, 0.08 y 0.125 mg de PCF) no se inhibió completamente la germinación de las esporas. De hecho, con las tres concentraciones de PCF se observó crecimiento de *R. oryzae* ENHE, producción de CO₂ y consumo de Glc. Sin embargo, sólo con 0.05 mg de PCF se observó un consumo considerable del O₂ durante la respiración.

En los cultivos con Glc como fuente de carbono, los rendimientos biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) y las velocidades específicas de crecimiento (μ) fueron menores en presencia de una mayor cantidad de PCF. Sin embargo, las velocidades específicas de consumo de Glc (q_s) en los cultivos con PCF fueron estadísticamente similares. Este fenómeno metabólico ya había sido observado por Quintas *et al.*, [130] al utilizar la levadura *Zygosaccharomyces bailii* (PYCC 3507) en cultivos con ácido benzoico, en su forma no dissociada. En aquel trabajo, al aumentar la concentración de preservador de alimentos en el medio, la μ disminuyó al igual que el $Y_{x/s}$. Sin embargo, los valores de q_s permanecieron constantes. La disminución del rendimiento celular en los cultivos de *Z. bailii* fue explicada por el hecho de que la levadura, al incrementar la concentración de ácido benzoico, utilizó mayor concentración de la fuente de carbono para mantener su actividad metabólica y menos fuente de carbono

para crecer. En otras palabras, *Z. bailii* consumió la fuente de carbono siempre a la misma velocidad (q_s) pero la usó para tolerar el efecto tóxico y no para crecer.

En el caso de los cultivos de *R. oryzae* ENHE con Glc, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y PCF, se observó un comportamiento similar al reportado por Quintas *et al.*, [130]. Después de agregar el PCF a los cultivos, *R. oryzae* ENHE utilizó principalmente la Glc para mantener su actividad metabólica lo más estable posible, es decir, sobrellevar el efecto tóxico del PCF.

El ácido glutámico (Glu) también fue una fuente de carbono asimilable para *R. oryzae* ENHE. Con Glu se obtuvieron prácticamente el doble de los $Y_{x/s}$ calculados en los cultivos con Glc. Sin embargo, las μ y las q_s fueron inferiores a las calculadas en los cultivos con Glc. Queda claro que al utilizar Glu, el efecto tóxico del PCF es menor para el metabolismo de *R. oryzae* ENHE, ya que una mayor cantidad de Glu se utilizó para el crecimiento y una menor cantidad para protegerse del efecto tóxico.

Como ha sido ampliamente reportado, el PCF a nivel celular tiene la capacidad de desacoplar la fosforilación oxidativa en mitocondrias, causando un déficit energético que debe ser compensado por otras vías, por ejemplo: la glicolisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el ciclo de las pentosas fosfato [131]. Carvalho *et al.*, [132] encontraron en su estudio toxiproteómico sobre el efecto del PCF en el metabolismo de *M. plumbeus* que el tóxico causaba una sobre expresión (acumulación con respecto a un control sin PCF) de casi todas las enzimas glicolíticas y algunas relacionadas con el metabolismo energético, por ejemplo: la Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CDH). La P5CDH junto con la prolina deshidrogenasa (PHD) catalizan la transformación de prolina a glutamato (Glu), el cual es un precursor del α -cetoglutarato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Boström y Johansson [131] observaron que el PCF incrementaba la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos por medio de un incremento en la actividad enzimática de la fumarasa. Es posible que al usar Glu como fuente de carbono, parte de éste haya sido utilizado por *R. oryzae* ENHE como precursor en la síntesis de α -cetoglutarato provocando, probablemente un incremento en el flujo metabólico a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y por lo tanto un incremento en la síntesis de ATP, mejorando así el crecimiento del hongo, en comparación con los cultivos con Glc donde el efecto tóxico del PCF fue mucho más acentuado.

R. oryzae ENHE tiene la capacidad de remover y/o degradar PCF [87]. En este trabajo se demostró que el primer proceso de eliminación es la sorción. En menor grado se observó que el hongo también degrada el tóxico. La degradación del PCF por la biomasa de *R. oryzae* ENHE depende de la respuesta metabólica del hongo a los nutrientes disponibles y a la solubilidad del PCF. Al metabolizar Glc, el pH del medio de cultivo disminuyó hasta 3.3, por la presencia de ácidos orgánicos formados durante el crecimiento de *R. oryzae* ENHE [133]. Mientras que al metabolizar Glu, la des-aminación del aminoácido produjo iones NH_3 que en solución se protonaron formando iones NH_4^+ , los cuales disminuyeron la concentración de H^+ en el medio de cultivo causando un incremento de pH hasta valores ligeramente neutros y alcalinos [134-136].

En condiciones ácidas, como las encontradas en los cultivos con Glc, la solubilidad del PCF es limitada, ya que aproximadamente el 95% de las moléculas del PCF se encuentran en forma neutra. Mientras que a pH ligeramente neutro, como el encontrado en los cultivos con Glu, aproximadamente el 99.8% de las moléculas de PCF se encuentran en forma disociada como pentaclorofenolatos [27, 115].

A pesar de los perfiles de pH diametralmente opuestos hallados en los cultivos, en las dos condiciones de cultivo realizadas en esta investigación, se encontró una gran capacidad de sorción de PCF por la biomasa de *R. oryzae* ENHE. En condiciones ácidas, neutras y alcalinas, la biomasa de *R. oryzae* ENHE sorbió más de 85% del PCF inicial. Esto reveló que, la biomasa de *R. oryzae* ENHE tiene la capacidad para remover tanto el PCF en forma neutra como su forma aniónica. En las isotermas de biosorción de PCF con biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE, se calculó que a pH 3.3, la capacidad máxima de sorción de PCF (q_m) fue entre 30.50 y 47.67 mg PCF g^{-1} biomasa húmeda ($\alpha=0.05$), mientras que la q_m a pH 7.5 fue entre 8.05 y 15.75 mg PCF g^{-1} biomasa húmeda ($\alpha=0.05$). En promedio, la q_m de PCF de la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 7.5 fue 3.1 veces menor a la calculada a pH 3.3 (capítulo 3, sección 3.3.4.2)

La alta capacidad de sorción de PCF de la biomasa de *R. oryzae* ENHE en condiciones neutro-alcalinas, se debió a que en los cultivos con Glu se produjo una mayor concentración de biomasa en comparación a la biomasa producida en los cultivos con Glc. Al haber mayor cantidad de biomasa en los cultivos, las moléculas de PCF tuvieron una

mayor superficie de contacto para realizar la sorción. Esto favoreció la interacción de PCF con la biomasa del zigomiceto, incluso a pesar del pH neutro-alcalino del medio de cultivo.

Después de que el PCF fue sorbido por la biomasa de *R. oryzae* ENHE, la degradación del PCF comenzó. Dentro de la biomasa, el PCF fue degradado mediante dos mecanismos. El primer mecanismo fue *orto*-metilación, y el segundo fue la descloración de tipo reductiva y oxidativa. Los intermediarios de la degradación de PCF se encontraron tanto en el medio de cultivo como en la biomasa del hongo. Sin embargo, en los cultivos con 0.5 mg de PCF (independientemente de la fuente de carbono), los intermediarios se encontraron solamente dentro de la biomasa.

La metilación es un proceso de eliminación ampliamente utilizado por los microorganismos para disminuir la toxicidad de algunas moléculas como los clorofenoles. El pentacloroanisol (PCA) es el producto de la *o*-metilación del PCF. El PCA es un anisol no ionizable altamente lipofílico (con un Log K_{ow} entre 5.31 y 5.45 [137]) con una gran tendencia a la bioacumulación en el medio ambiente [138].

A pesar de que el PCA es 10 veces menos soluble en agua que el PCF, se ha comprobado que el PCA es 1000 veces menos tóxico que el PCF utilizando como modelo de toxicidad al salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) [139]. La *o*-metilación de PCF en basidiomicetos como *P. chrysosporium* (OGC101) está regulada principalmente por la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno [52]. Sin embargo, se ha observado que al variar parámetros de cultivo como: la agitación, oxigenación y tipo de cultivo (líquido o sólido) se puede favorecer o limitar la formación de PCA; incluso hasta llegar a la mineralización [138, 140].

R. oryzae ENHE formó PCA con ambas fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas en esta investigación. Pocos son los hongos filamentosos, no pertenecientes a los basidiomicetos, que han presentado la capacidad metabólica para *o*-metilar PCF. Szewczyk *et al.*, 2003 [73] aislaron tres cepas de hongos microscópicos en sitios contaminados con aceites y encontraron que en medio Sabouraud los hongos presentaron la capacidad metabólica de metilar PCF. Una de estas cepas se identificó como *M. ramosissimus* IM 6203.

Posteriormente, se encontró que *M. ramosissimus* también podía formar otro tipo de anisoles como el pentacloroetoxibenceno (PCEB) pero en concentraciones traza [74].

En los cultivos con Glc, el PCA sólo se cuantificó en la biomasa de *R. oryzae* ENHE; posiblemente porque en condiciones ácidas se favorece la sorción de PCA en la biomasa. En los cultivos con Glc y 0.5 mg de PCF, la biomasa de *R. oryzae* ENHE produjo 11.2 veces más PCA en comparación con los cultivos con 2 mg de PCF. Sin embargo, en la biomasa crecida con Glc y 2 mg de PCF se encontró un mayor número de intermediarios de la degradación de PCF; incluso en mayor cantidad que el mismo PCA.

En los cultivos con Glu, la formación de PCA fue estadísticamente similar con ambas cantidades iniciales de PCF. Sin embargo, en los cultivos con 2 mg de PCF, el PCA se encontró en el medio cultivo. A las 436 h, ya no se cuantificó PCA en el medio de cultivo pero se encontró PCA en la biomasa de *R. oryzae* ENHE. La cantidad de PCA que se acumuló y cuantificó en el medio de cultivo fue estadísticamente similar a la cantidad de PCA que se cuantificó en la biomasa. Al parecer en un medio neutro, como el encontrado en los cultivos con Glu y 2 mg de PCF, la liberación del PCA de la biomasa se favoreció.

Como se observó, la *o*-metilación posiblemente es un mecanismo de respuesta natural de *R. oryzae* ENHE para combatir el efecto tóxico del PCF. Esto debido a que, independientemente de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas, el zigomiceto *o*-metiló el PCF. Sin embargo, es claro que la *o*-metilación de PCF por la biomasa de *R. oryzae* ENHE está regulada o es dependiente del tipo de fuente de carbono y nitrógeno utilizada. Puesto que, la biomasa producida con Glu presentó una mayor capacidad para *o*-metilar PCF en comparación a la biomasa obtenida con Glc (gráfico 4.22). Es posible, que la *o*-metilación del PCF en los cultivos de *R. oryzae* ENHE haya sido catalizada por una metiltransferasa dependiente de *S*-adenosil-L-metionina (SAM) asociada al micelio del hongo, como fue reportado para *Trichoderma longibrachiatum* (CECT 20431) en la *o*-metilación de 2,4,6-triclorofenol [141].

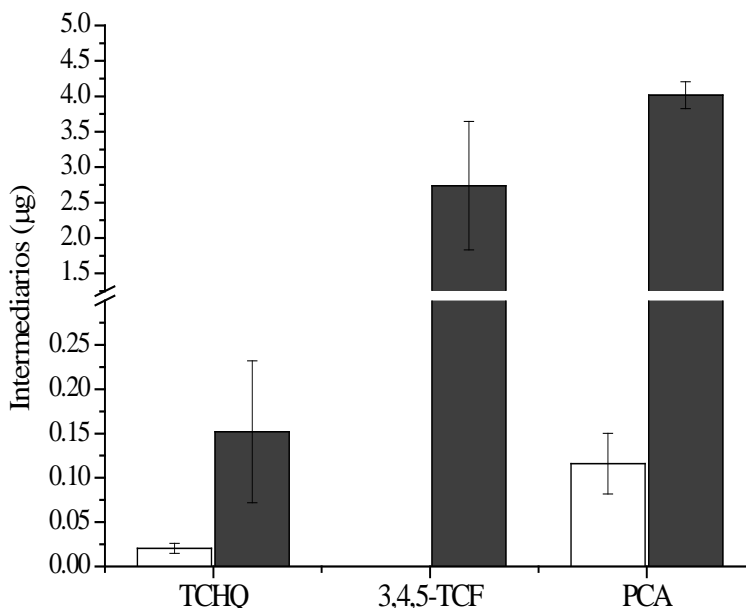


Gráfico 4.22 Intermediarios de la degradación de PCF cuantificados dentro de las biomásas producidas con Glc-(NH₄)₂SO₄ y Glu-NaNO₃ y con 2 mg de PCF, a las 264 y 436 h, respectivamente. (□) medio Lee 2x con Glc-(NH₄)₂SO₄; (■) medio Lee 2x con Glu-NaNO₃.

Otra estrategia metabólica de *R. oryzae* ENHE para contrarrestar el efecto tóxico fue la descloración del PCF en posición *para*. Esta descloración fue de tipo oxidativa y debido al pre-tratamiento al que se sometieron las muestras, el intermediario identificado fue la tetraclorohidroquinona (TCHQ). En la degradación de PCF con *P. chrysosporium*, en condiciones de cultivo limitantes y no limitantes de nitrógeno, el primer paso de la ruta de degradación de PCF consiste en la *p*-oxidación del PCF formando tetracloro-*p*-benzoquinona (TCpBQ) y es catalizado por las enzimas extracelulares LiP o MnP. La siguiente etapa de la ruta consiste en la reducción de TCpBQ a TCHQ por mecanismos enzimáticos (ligninasas extracelulares o enzimas asociadas a biomasa) o no-enzimáticos [52]. Al ser la TCHQ el primer intermediario de la degradación de PCF, este intermediario se agotó rápidamente, ya que a partir de él se forman otros intermediarios metabólicos; por lo que suele ser complicado encontrar este primer intermediario en grandes cantidades. Aunado a esto, las quinonas son moléculas altamente reactivas y oxidantes, actúan como electrófilos, pueden reaccionar con nucleósidos, nucleótidos y con macromoléculas como el ADN y proteínas formando aductos [11, 142-145]; lo que también provoca su desaparición.

Se demostró que la TCHQ es también el primer intermediario de la degradación de PCF por *R. oryzae* ENHE. Al contrario de algunos otros intermediarios de la degradación de PCF identificados y no identificados, la TCHQ no se acumula en los cultivos de *R. oryzae* ENHE, sino que se consume. Se observó en los cultivos con Glc y 2 mg de PCF, que la TCHQ desaparece por completo del medio cultivo después de las 168 h. Szewczyk y Długoński [74] observaron una disminución de TCHQ similar en la degradación de PCF con *M. ramosissimus* pero en condiciones limitantes de nutrientes, donde la biomasa del hongo previamente aclimatada al plaguicida se re-suspendió en agua estéril con PCF y se incubó. Sin embargo, estos mismos autores encontraron que *M. ramosissimus* en condiciones no limitantes de nutrientes (medio Sabouraud, medio mineral con 10g Glc L⁻¹ y medio mineral con 5% de acetite de motor gastado como única fuente de carbono), la TCHQ se acumulaba en los cultivos.

R. oryzae ENHE lleva a cabo la descloración oxidativa del PCF en la biomasa del hongo, porque ahí fue donde se concentró la mayor cantidad de TCHQ. Actualmente no ha sido completamente esclarecido qué enzima es la responsable de la oxidación del PCF en zigomicetos. Sin embargo, en algunas investigaciones se ha propuesto que posiblemente la degradación de PCF en zigomicetos se lleva a cabo con enzimas relacionadas a la biomasa y no a enzimas extracelulares. Szewczyk y Długoński [74] relacionaron la degradación de PCF a la actividad enzimática de citocromo P-450 en *M. ramosissimus*, ya que al inhibir a esta enzima con Metirapona y 1-amonobenzotriazola, la degradación de PCF se detuvo, no se formó TCHQ u otros intermediarios. En la degradación de PCF con *P. chrysosporium* (BKM-F-1767) también se ha comprobado la contribución de la citocromo P-450 en la formación de TCHQ [146].

Por el contrario, en la degradación de PCF con *M. plumbeus* (DMS 16513), la formación de intermediarios no se relacionó con la actividad enzimática del citocromo P-450, porque la producción de los intermediarios metabólicos de la degradación de PCF, incluyendo la TCHQ, no se afectó por la inhibición del citocromo P-450. No obstante, se concluyó que la oxidación de PCF se da de forma intracelular, ya que un concentrado de enzimas extracelulares producidas por *M. plumbeus* no pudo degradar PCF [132]. En este trabajo se

encontró principalmente la TCHQ en la biomasa y sólo trazas se cuantificaron en el medio de cultivo; probablemente porque la cloroquinona fue excretada por la biomasa del hongo.

El metabolismo versátil de *R. oryzae* ENHE también decloró reductivamente al PCF. En la biomasa producida con Glc y 2 mg de PCF, se encontró 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TCF) y en el medio de cultivo, 3,4,5-triclorofenol (3,4,5-TCF). El 3,4,5-TCF también se encontró en los cultivos con Glu, pero sólo en la biomasa del hongo (gráfico 4.22). Anteriormente, Szewczyk y Długoński [74] ya habían reportado que un zigomiceto, *M. ramosissimus*, en medio Sabouraud podía declorar reductivamente al PCF formando trazas de 2,3,4,5-TCF y 2,3,4,6-TCF. Sin embargo, estos investigadores no encontraron ningún triclorofenol. De hecho, este es el primer trabajo donde se reporta que un zigomiceto es capaz de formar un triclorofenol como intermediario de la degradación de PCF.

El 3,4,5-TCF en los cultivos con Glc y 2 mg de PCF apareció en el medio de cultivos 48 h después de que se agregó el PCF, alcanzó su máxima producción a las 168 h y disminuyó su concentración hacia el final del cultivo. Sin embargo, no se encontró 3,4,5-TCF en la biomasa de *R. oryzae* ENHE. En el caso de los cultivos con Glu, el 3,4,5-TCF se encontró solamente en la biomasa. Posiblemente, en los cultivos con Glc y 2 mg de PCF, el 3,4,5-TCF del medio de cultivo fue metabolizado en la biomasa de *R. oryzae* ENHE formando otra clase de intermediarios (gráfico 4.22). Esta hipótesis se propone por los intermediarios que no fueron identificados en la biomasa del hongo.

En contraste, el micelio de *R. oryzae* ENHE producido con Glu y PCF acumuló 3,4,5-TCF; probablemente porque la biomasa tiene menor capacidad metabólica para degradar 3,4,5-TCF (gráfico 4.22). En general, *R. oryzae* ENHE degradó PCF formando otra clase diferente de intermediarios no identificados en los cultivos con Glu, en menor número, en comparación a los intermediarios encontrados y no identificados en los cultivos con Glc.

4.6 Conclusiones

En este trabajo de investigación se demostró el efecto del PCF en el crecimiento de *R. oryzae* ENHE, así como los mecanismos metabólicos empleados para disminuir el efecto tóxico del PCF; todo en función de la composición del medio de cultivo y la cantidad

inicial de PCF. Las conclusiones a las que se llegaron en esta investigación fueron las siguientes:

- El principal mecanismo de eliminación de PCF por *R. oryzae* ENHE es la biosorción, independientemente de la fuente de carbono y nitrógeno.
- La *o*-metilación, descloración oxidativa y reductiva son mecanismos metabólicos que *R. oryzae* ENHE utiliza para degradar PCF.
- La degradación de PCF se lleva a cabo intracelularmente; más del 90% del PCF inicial es biosorbido desde los primeros minutos y la mayor parte de los intermediarios de la degradación de PCF identificados y no identificados se encontraron dentro de la biomasa de *R. oryzae* ENHE.
- La biomasa de *R. oryzae* ENHE obtenida de los cultivos con Glc-(NH₄)₂SO₄ tiene mayor actividad metabólica con respecto a la degradación de PCF que la biomasa producida con Glu-NaNO₃ debido a que un mayor número de intermediarios de la degradación se separaron ahí y se encontró menos acumulación de los mismos.

Capítulo 5

5 Remoción de PCF por *R. oryzae* ENHE en un biorreactor de tanque agitado

5.1 Metodología experimental

Se estudió la remoción de PCF por *R. oryzae* ENHE en un biorreactor de tanque agitado (STR, acrónimo en inglés) con Glu como fuente de carbono. El diagrama de flujo de la figura 5.1 muestra la estrategia metodológica usada. Se identificaron y cuantificaron los intermediarios de la degradación de PCF formados durante el cultivo de *R. oryzae* ENHE en el biorreactor y se compararon con los productos de la reacción *in vitro* de la peroxidasa de rábano (HRP, acrónimo en inglés) con el PCF.

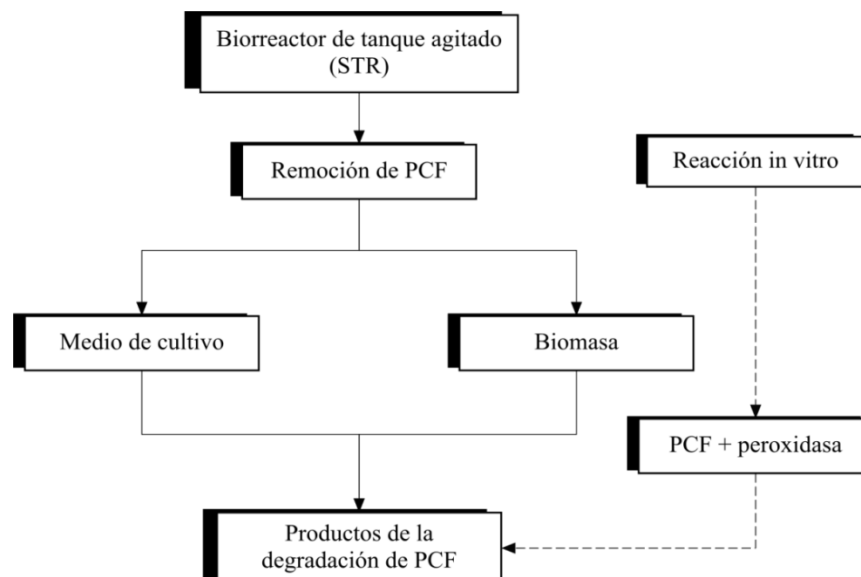


Figura 5.1 Diagrama de flujo donde se sintetiza las actividades realizadas durante el estudio de remoción de PCF con *R. oryzae* ENHE en un STR.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Biorreactor

El crecimiento de *R. oryzae* ENHE y la eliminación de PCF se llevaron a cabo en medio de cultivo Lee (2X) con ácido glutámico (Glu) como fuente de carbono (capítulo 5, sección 4.1.1). Se utilizó un reactor de tanque agitado (STR) con una capacidad máxima de 2 L y un volumen de trabajo de 800 mL. El medio de cultivo se inoculó con 1×10^3 esporas mL^{-1} . El biorreactor se alimentó con aire a un flujo de 1.2 L min^{-1} y se mantuvo a una velocidad de agitación de 150 rpm a una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

El PCF, 32 mg (40 mg L^{-1}), se adicionó al medio de cultivo 72 h después de haber arrancado el biorreactor. Se tomaron muestras del medio de cultivo a las 0, 72, 120, 144, 168, 192 y 216 h. La biomasa producida en el biorreactor se recuperó por filtración al vacío, al final del cultivo. La biomasa recuperada, se enjuagó varias veces con H_2O , se congeló a -20°C y se liofilizó. La biomasa liofilizada se pulverizó y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

5.2.2 Transformación enzimática *in vitro* del PCF

El PCF se transformó enzimáticamente, a otro tipo de compuestos aromáticos clorados, con peroxidasa de rábano comercial (HRP). Para realizar la reacción enzimática se utilizó como base la metodología descrita por Longoria *et al.*, [147].

En la reacción enzimática *in vitro* del PCF, se adicionaron 3.3 mg de HPR en 490 μL de amortiguador de fosfatos 60 mM (pH 6.0). Se agregaron 200 μL de KCl 20 mM, 200 μL de isopropanol y el PCF necesario para llegar a tener 40 mg L^{-1} . La reacción enzimática inició al colocar 40 μL de H_2O_2 al 30%.

La reacción se incubó a 30°C durante 20 min, y se detuvo con 100 μL de HCl 6N. Posteriormente, la solución resultante se saturó con NaCl y los productos de reacción se extrajeron con CH_2Cl_2 (dos extracciones, cada una con 500 μL de solvente). Después de la extracción, el disolvente se evaporó y los productos de reacción se derivatizaron con anhídrido acético.

5.2.3 Pre-tratamiento de muestras y cuantificación de PCF e intermediarios

El procedimiento experimental para la extracción, derivatización, identificación y cuantificación de los compuestos aromáticos clorados en las muestras de medio de cultivo y biomasa fue el mismo que se reportó en la sección de materiales y métodos del capítulo 4. Con la excepción de un etapa de centrifugación ($12,000 \times g$ por 10 min) posterior a la reducción de la biomasa, donde se separaron los lípidos de la suspensión resultante después de la reducción. Al sobrenadante libre de lípidos se le consideró como fracción no lipídica, mientras que a los lípidos se les consideró como fracción lipídica de la biomasa.

La fracción lipídica se re-suspendió en 200 μL de HCl 12N, se homogenizó en un agitador Vórtex durante 10 min y se extrajo con hexano (tres extracciones, cada una con 500 μL de solvente).

5.3 Resultados

Como se demostró en el capítulo 4, el metabolismo de *R. oryzae* ENHE puede utilizar al Glu como fuente de carbono, y posiblemente también como fuente de nitrógeno. Sin embargo, el crecimiento del hongo en 50 mL de medio Lee 2X con Glu es lento, ya que se observa un crecimiento pobre hasta las 144 h. En contraste, en el STR se observó mayor crecimiento de *R. oryzae* ENHE desde las 24 h. El PCF, 32 mg de PCF, se adicionó a las 72 h. Al final del cultivo en el STR, se obtuvieron 144.5 mg biomasa seca L^{-1} .

El pH del medio de cultivo en el STR incrementó de 5.3 a 6.2 después de 72 h, y disminuyó a 5.93 después de la adición del PCF (gráfico 5.1). Inmediatamente después de la adición, se cuantificaron solamente 1.9 ± 0.3 mg de PCF en el medio de cultivo. Posteriormente, la cantidad de PCF en el medio de cultivo incrementó. A las 216 h, en el medio de cultivo, se cuantificaron 3.05 ± 0.3 mg de PCF, lo cual equivale al 9.5% del PCF inicial.

En ninguna de las muestras del medio de cultivo se identificaron intermediarios de la degradación del PCF.

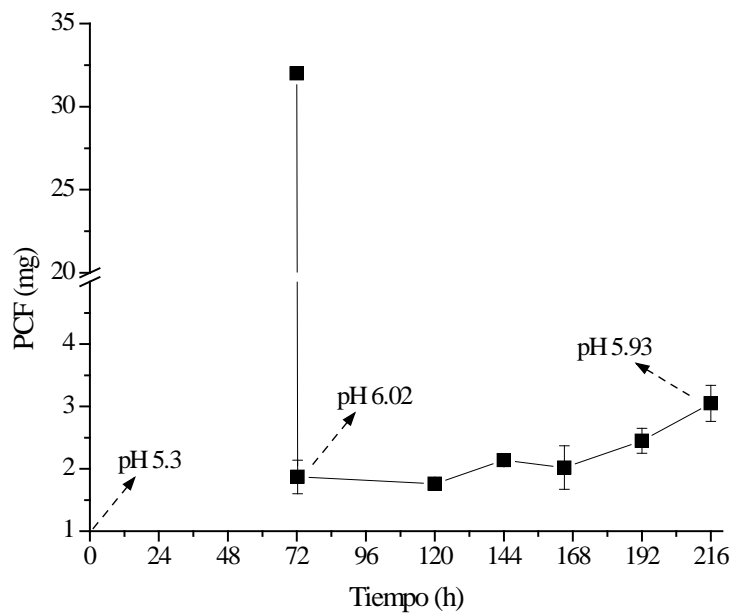


Gráfico 5.1 PCF cuantificado en el medio de cultivo en el STR durante la biodegradación de 32 mg de PCF con Glu como fuente de carbono.

En la biomasa de *R. oryzae* ENHE, recuperada a las 216 h, se identificaron como intermediarios de la degradación de PCF a la tetraclorohidroquinona (TCHQ) y al pentacloroanisol (PCA). Sin embargo, también se observó la presencia de otro posible intermediario de la degradación del PCF, el cual presentó un t_R de 6.33 min (gráfico 5.2).

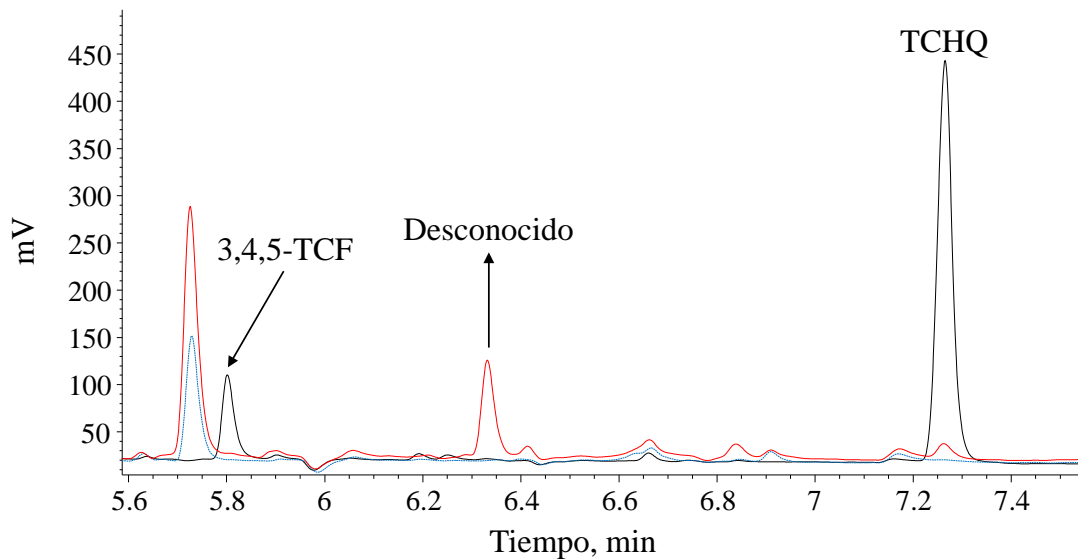


Gráfico 5.2 Cromatograma obtenido de la biomasa de *R. oryzae* ENHE producida con Glu, NaNO_3 y 32 mg de PCF en un STR. (—) biomasa que estuvo en contacto con PCF; (---) biomasa control sin PCF; (—) estándares de 3,4,5-TCF y TCHQ.

En la biomasa total producida en el STR, se cuantificaron 1.15 ± 0.2 mg de PCF (3.6% del PCF inicial), 1.06 ± 0.08 μg de TCHQ y 13.6 ± 0.5 μg de PCA. La degradación de PCF por *R. oryzae* ENHE en un STR fue equivalente al 0.05% del PCF inicial.

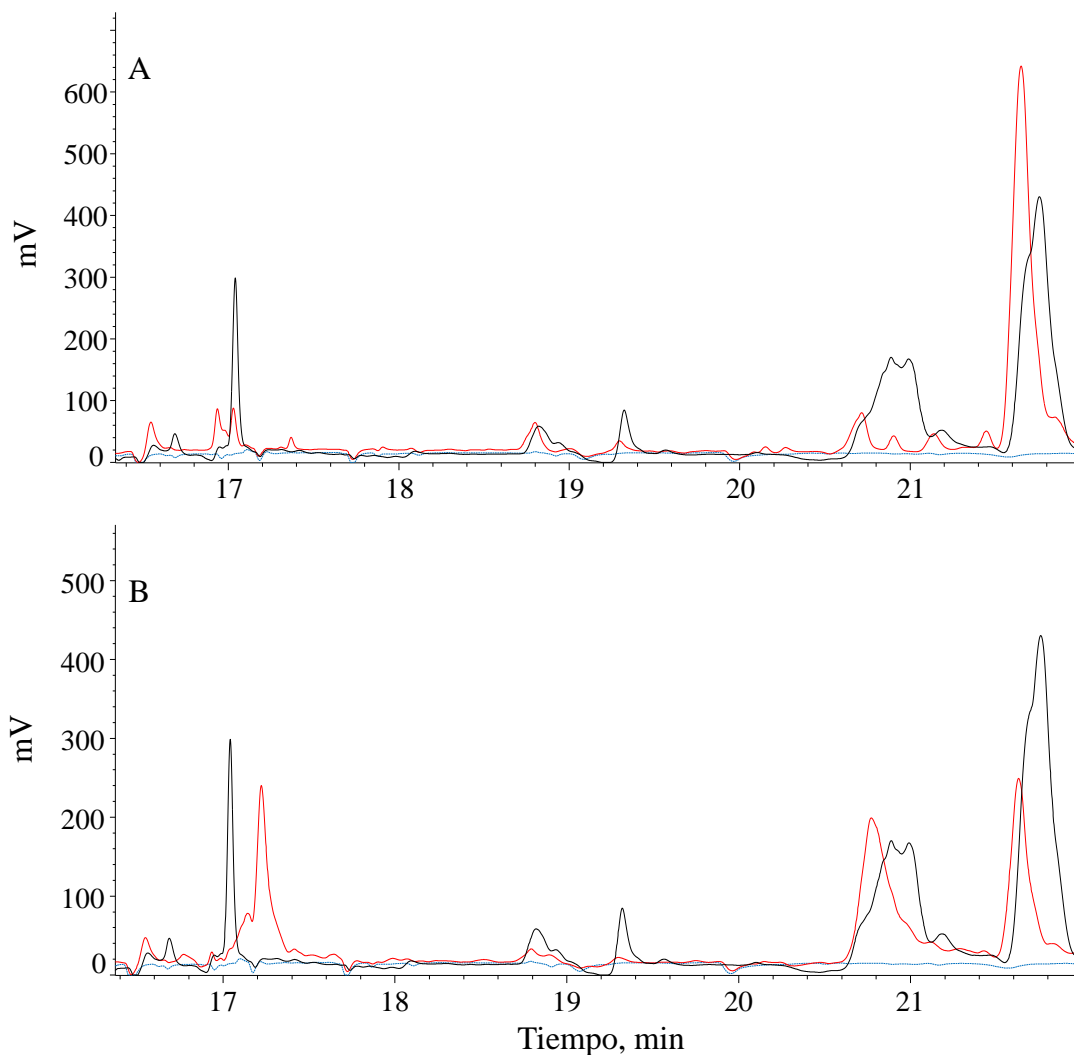


Gráfico 5.3 Posibles moléculas cloradas observados en la biomasa de *R. oryzae* ENHE. A) Fracción no lipídica. B) Fracción lipídica. (—) cromatograma obtenido después de la reacción de PCF con HRP; (—) cromatograma obtenido de los extractos de biomasa en presencia de PCF; (---) cromatograma obtenido de los extractos de biomasa control, sin PCF.

Durante la separación cromatográfica de las muestras de biomasa de *R. oryzae* ENHE se separaron analitos en la última sección del análisis cromatográfico; donde se encuentran las mayores temperaturas (gráfico 5.3A, B). Estos analitos son moléculas cloradas con un peso molecular superior al del PCF, posiblemente dímeros o polímeros de él mismo. Con la

finalidad de comprobar si los analitos separados en la biomasa eran moléculas cloradas de alto peso molecular, se llevó a cabo la reacción *in vitro* del PCF con la peroxidasa de rábano (HRP). Los productos de la reacción entre la HRP y el PCF se muestran en el gráfico 5.3

Como se observa en los cromatogramas del gráfico 5.3, algunos de los compuesto clorados formados después de la reacción del PCF con la HRP coinciden con los encontrados en la biomasa de *R. oryzae* ENHE (gráfico 5.3A). Aunque, la gran mayoría de los productos de reacción no coinciden con los analitos separados en la biomasa (gráfico 5.3B). Las moléculas cloradas separadas en la biomasa de *R. oryzae* ENHE muestran t_R muy cercanos a los productos de reacción de la HRP, indicando que posiblemente las moléculas cloradas formadas por el metabolismo de *R. oryzae* ENHE son diferentes a las formadas en la reacción enzimática de la HRP con el PCF.

5.4 Discusión

El ácido glutámico (Glu) ha demostrado ser una fuente de carbono (y posiblemente de nitrógeno) eficiente para la producción de biomasa de *R. oryzae* ENHE, lo cual ha sido útil en la remoción de PCF. Sin embargo, la asimilación del aminoácido por el zigomiceto es lenta en cultivo líquido en matraces Erlenmeyer (capítulo 4). En contraste, al cultivar a *R. oryzae* ENHE en un STR, la velocidad de crecimiento y la producción total de biomasa mejoraron considerablemente.

La remoción del PCF en el STR comenzó justo después de su adición al medio de cultivo. La biomasa de *R. oryzae* ENHE sorbió inicialmente el 94.1% del PCF inicial. Con el transcurso del tiempo, parte del PCF sorbido por la biomasa fue liberado al medio de cultivo. Pallerla y Chambers [148] reportaron un comportamiento similar de sorción/desorción durante la biodegradación de PCF con *Trametes versicolor* (ATCC 20869). Sin embargo, la sorción de PCF por *T. versicolor* no fue tan rápida como la observada con *R. oryzae* ENHE.

En la degradación de PCF con *P. chysosporium* (BKM-F-1767) en un biorreactor de crecimiento suspendido con mezclador mecánico (similar a un STR) reportado por Kang *et al.*, [149], se encontró que el primer paso en la remoción del PCF es la sorción por la

biomasa del hongo. Posteriormente, el PCF puede ser degradado de forma intra y/o extracelular. Pallerla y Chambers [148] concluyeron que la degradación de PCF por *T. versicolor* se lleva a cabo intracelularmente, ya que el PCF sorbido por la biomasa desaparece durante el periodo de incubación y las enzimas extracelulares producidas por el basidiomiceto no presentaron la capacidad para disminuir la concentración del PCF en el medio de cultivo. Con *R. oryzae* ENHE, la degradación de PCF es un STR se llevó a cabo también intracelularmente y estuvo precedida por la sorción.

Dentro de la biomasa de *R. oryzae* ENHE se identificaron como metabolitos de la degradación de PCF a la TCHQ, PCA y un metabolito clorado (no identificado) con un t_R de 6.33 min. Este último metabolito, ya había sido localizado en la biomasa de *R. oryzae* ENHE producida en matraces Erlenmeyer (capítulo 4). Los metabolitos de la degradación de PCF identificados en la biomasa de *R. oryzae* ENHE fueron formados por reacciones de oxidación y conjugación. Por el contrario, Shim y Kawamoto [150], en la degradación de PCF con *P. chrysosporium* (BKM-F-1767) en un reactor de lecho empacado, encontraron como metabolitos al 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF) y al 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TCF), los cuales son producto de una descloración de tipo reductiva llevada a cabo por la enzima extracelular LiP. Sin embargo, Shim y Kawamoto [150] no indicaron cuanto del PCF alimentado al reactor fue degradado y cuanto fue sorbido por la biomasa y el soporte. Sólo indicaron la desaparición del PCF en el efluente.

Independientemente de la sorción, conjugación y degradación; la polimerización es otro mecanismo de eliminación de compuestos aromáticos para disminuir su toxicidad, su biodisponibilidad y su impacto ambiental; por medio de la formación de sólidos insolubles estables en agua [151]. La reacción de síntesis de dímeros y polímeros de PCF puede ser catalizada por peroxidasas y lacasas en condiciones *in vitro* [56, 147]. En la biomasa de *R. oryzae* ENHE producida con PCF en un SRT, se encontraron posibles moléculas aromáticas cloradas con un peso molecular superior al PCF. Los productos obtenidos en la reacción *in vitro* de la HRP con el PCF corroboraron la naturaleza dimérica y/o polimérica de las moléculas aromáticas cloradas separadas en la fracción lipídica y no lipídica de la biomasa de *R. oryzae* ENHE. Kazunga *et al.*, [152] demostraron que el principal producto de reacción entre la HRP y el PCF es un dímero inestable (en disolventes orgánicos)

formado por dos radicales pentaclorofenoxi (2,3,4,5,6-pentacloro-4-pentacloropenoxi-2,5-ciclohexadieno). Por su parte, Longoria *et al.*, [147] encontraron que un polímero de PCF también puede llegar a formarse en la reacción de la HRP con el PCF; aunque no indicaron su estructura.

El proceso metabólico de síntesis de dímeros y/o polímeros de PCF por zigomicetos es desconocido y no había sido reportado hasta ahora. Se propone realizar estudios proteómicos para comprender la naturaleza de estas reacciones. Sin embargo, variables de cultivo controlables en un STR, como son agitación por propelas y aireación posiblemente pueden favorecer la aparición de estas estructuras diméricas y/o poliméricas del PCF en la biomasa de *R. oryzae* ENHE.

5.5 Conclusiones

En el STR se mejoró considerablemente la producción total de biomasa de *R. oryzae* ENHE en medio de cultivo Lee 2X con Glu. A pesar de que se inoculó el medio de cultivo con 1000 veces menos concentración de esporas en comparación con los cultivos realizados en matraces Erlenmeyer. De los resultados experimentales obtenidos se concluyó:

- El principal mecanismo de remoción de PCF por *R. oryzae* ENHE cultivado en un STR fue la biosorción.
- Al parecer, *R. oryzae* ENHE tiene la capacidad metabólica para formar estructuras diméricas y/o poliméricas utilizando como unidades estructurales moléculas aromáticas cloradas. Sin embargo, es necesaria la identificación de estas estructuras para llegar a una conclusión sólida.

6 Recomendaciones

Con base en los resultados experimentales obtenidos en esta investigación se sugiere:

- Incrementar la temperatura de incubación durante los experimentos de biosorción, ya que esta variable favorece la interacción entre el PCF y los sitios activos de sorción de la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE.
- Determinar si los lípidos de la biomasa de *R. oryzae* ENHE están involucrados en la remoción de PCF.
- Realizar algunas modificaciones químicas a las partículas de biomasa seca de *R. oryzae* ENHE para incrementar su capacidad de sorción.
- En la sorción de PCF con biomasa húmeda, investigar si la remoción de PCF es debida a adsorción o absorción.
- Estudiar la desorción del PCF sorbido por la biomasa de *R. oryzae* ENHE.
- Determinar el efecto de la temperatura sobre la biosorción de PCF con biomasa húmeda, ya que no hay información sobre este tema.
- Identificar por análisis de espectrometría de masas los intermediarios de la degradación de PCF no identificados en este estudio. La identificación de estas moléculas es clave para determinar la posible ruta de degradación de PCF por *R. oryzae* ENHE.
- Investigar donde se encuentra el PCF faltante (no cuantificado) en los cultivos de *R. oryzae* ENHE y determinar si parte de él se pierde por volatilización.
- Realizar estudios proteómicos enfocados en encontrar la(s) enzima(s) involucrada(s) en la metilación y descloración del PCF.
- Estudiar el papel del ácido glutámico en la disminución del efecto tóxico del PCF sobre el crecimiento de *R. oryzae* ENHE; por medio de estudios metabólicos y proteómicos.
- Identificar las posibles estructuras diméricas y/o poliméricas de PCF formadas en los cultivos de *R. oryzae* ENHE.

7 Referencias

- [1] J.P. Seiler, Pentachlorophenol, *Mutat. Res.*, 257 (1991) 27-47.
- [2] D.G. Crosby, IUPAC Reports on pesticides (14) Environmental chemistry of pentachlorophenol, *Pure Appl. Chem.*, 53 (1981) 1051-1080.
- [3] U.S. EPA, IRIS Toxicological review of pentachlorophenol, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, EPA/635/R-09/004F, 2010.
- [4] H.A. Hattemer-Frey, C.C. Travis, Pentachlorophenol: environmental partitioning and human exposure, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18 (1989) 482-489.
- [5] P.A. Demers, H.W. Davies, M.C. Friesen, C. Hertzman, A. Ostry, R. Hershler, K. Teschke, Cancer and occupational exposure to pentachlorophenol and tetrachlorophenol (Canada), *Cancer Causes Control*, 17 (2006) 749-758.
- [6] T. Meissner, F. Schweinsberg, Pentachlorophenol in the indoor environment: Evidence for a correlation between pentachlorophenol in passively deposited suspended particulate and in urine of exposed persons, *Toxicol. Lett.*, 88 (1996) 237-242.
- [7] H.J. Geyer, I. Scheunert, F. Korte, Distribution and bioconcentration of the environmental chemical pentachlorophenol (PCP) in different tissues of humans, *Chemosphere*, 16 (1987) 887-899.
- [8] E.C. Weinbach, The effect of pentachlorophenol on oxidative phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 545-550.
- [9] E.C. Weinbach, Biochemical basis for the toxicity of pentachlorophenol, *Science*, 124 (1956) 940-940.
- [10] B.I. Escher, M. Snozzi, R.P. Schwarzenbach, Uptake, speciation, and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes, *Environ. Sci. Technol.*, 30 (1996) 3071-3079.
- [11] V.G. Vaidyanathan, P.W. Villalta, S.J. Sturla, Nucleobase-dependent reactivity of a quinone metabolite of pentachlorophenol, *Chem. Res. Toxicol.*, 20 (2007) 913-919.
- [12] U.S. EPA, Pentachlorophenol, hazard summary-created in April 1992; Revised in January 2000, <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/pentachl.html>.
- [13] IARC, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides, Lyon, 1991.
- [14] A.M. Ruder, J.H. Yiin, Mortality of US pentachlorophenol production workers through 2005, *Chemosphere*, 83 (2011) 851-861.

- [15] I. Gerhard, A. Frick, B. Monga, B. Runnebaum, Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction, *Environ. Res.*, 80 (1999) 383-388.
- [16] FAO, Decision guidance documents: Pentachlorophenol and its salts and esters, Joint FAO/UNEP programme for the operation of prior informed consent, in, Food and Agriculture Organization of the United Nations, United Nations Environment Program, Rome-Geneva, 1996.
- [17] U. Heudorf, S. Letzel, M. Peters, J. Angerer, PCP in the blood plasma: Current exposure of the population in Germany, based on data obtained in 1998, *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 203 (2000) 135-139.
- [18] J. Muir, G. Eduljee, PCP in the freshwater and marine environment of the European Union, *Sci.Total Environ.*, 236 (1999) 41-56.
- [19] J.C. Ge, J.L. Pan, Z.L. Fel, G.H. Wu, J.P. Giesy, Concentrations of pentachlorophenol (PCP) in fish and shrimp in Jiangsu Province, China, *Chemosphere*, 69 (2007) 164-169.
- [20] CICOPLAFEST, Catalogo de plaguicidas, SSA, SAGARPA, SEMARNAT, SE, México, 2004.
- [21] W.W. Zheng, X. Wang, H. Yu, X.G. Tao, Y. Zhou, W.D. Qu, Global trends and diversity in pentachlorophenol levels in the environment and in humans: A Meta-Analysis, *Environ. Sci. Technol.*, 45 (2011) 4668-4675.
- [22] J.L. Wang, C. Chen, Biosorbents for heavy metals removal and their future, *Biotechnol. Adv.*, 27 (2009) 195-226.
- [23] K. Chojnacka, Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications, *Environ. Int.*, 36 (2010) 299-307.
- [24] F. Veglio, F. Beolchini, Removal of metals by biosorption: A review, *Hydrometallurgy*, 44 (1997) 301-316.
- [25] J.P. Bell, M. Tsezos, Removal of hazardous organic pollutants by adsorption on microbial biomass, *Water Sci. Technol.*, 19 (1987) 409-416.
- [26] K.J. Kennedy, J.H. Lu, W.W. Mohn, Biosorption of chlorophenols to anaerobic granular sludge, *Water Res.*, 26 (1992) 1085-1092.
- [27] S. Brandt, A.P. Zeng, W.D. Deckwer, Adsorption and desorption of pentachlorophenol on cells of *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1, *Biotechnol. Bioeng.*, 55 (1997) 480-489.
- [28] C.J. Daughney, J.B. Fein, Sorption of 2,4,6-trichlorophenol by *Bacillus subtilis*, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 749-752.

- [29] Z. Aksu, J. Yener, A comparative adsorption/biosorption study of mono-chlorinated phenols onto various sorbents, *Waste Manage.*, 21 (2001) 695-702.
- [30] Z. Aksu, J. Yener, Investigation of the biosorption of phenol and monochlorinated phenols on the dried activated sludge, *Process Biochem.*, 33 (1998) 649-655.
- [31] P. Benoit, E. Barriuso, R. Calvet, Biosorption characterization of herbicides, 2,4-D and atrazine, and two chlorophenols on fungal mycelium, *Chemosphere*, 37 (1998) 1271-1282.
- [32] Y. Sag, Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: A review, *Sep. Purif. Methods*, 30 (2001) 1-48.
- [33] S.M. Bowman, S.J. Free, The structure and synthesis of the fungal cell wall, *Bioessays*, 28 (2006) 799-808.
- [34] R.S. Bai, T.E. Abraham, Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*, *Water Res.*, 36 (2002) 1224-1236.
- [35] W.Y. Baik, J.H. Bae, K.M. Cho, W. Hartmeier, Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof, *Bioresour. Technol.*, 81 (2002) 167-170.
- [36] N. Fiol, I. Villaescusa, Determination of sorbent point zero charge: usefulness in sorption studies, *Environ. Chem. Lett.*, 7 (2009) 79-84.
- [37] K.Y. Foo, B.H. Hameed, Insights into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.*, 156 (2010) 2-10.
- [38] I. Langmuir, The constitution and fundamental properties of solids and liquids Part I Solids, *J. Am. Chem. Soc.*, 38 (1916) 2221-2295.
- [39] S.J. Allen, G. McKay, J.F. Porter, Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems, *J. Colloid Interface Sci.*, 280 (2004) 322-333.
- [40] H. Freundlich, Concerning adsorption in solutions, *Zeitschrift Für Physikalische Chemie--Stoichiometrie Und Verwandtschaftslehre*, 57 (1906) 385-470.
- [41] B.K. Nandi, A. Goswami, M.K. Purkait, Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin, *J. Hazard. Mater.*, 161 (2009) 387-395.
- [42] A. Khaled, A. El Nemr, A. Ei-Sikaily, O. Abdelwahab, Removal of direct N blue-106 from artificial textile dye effluent using activated carbon from orange peel: adsorption isotherm and kinetic studies, *J. Hazard. Mater.*, 165 (2009) 100-110.
- [43] O. Redlich, D.L. Peterson, A useful adsorption isotherm, *J. Phys. Chem.*, 63 (1959) 1024-1024.
- [44] J.A. García-Calzon, M.E. Diaz-Garcia, Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers, *Sens. Actuators, B*, 123 (2007) 1180-1194.

- [45] S. Lagergren, Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe, *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens, Handlingar*, 1898.
- [46] S. Chowdhury, P. Saha, Adsorption kinetic modeling of Safranin onto Rice Husk Biomatrix using pseudo-first- and pseudo-second-order kinetic models: comparison of linear and non-linear methods, *Clean: Soil, Air, Water*, 39 (2011) 274-282.
- [47] Y.S. Ho, G. McKay, A comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents, *Process Saf. Environ. Prot.*, 76 (1998) 332-340.
- [48] Y.S. Ho, G. McKay, Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochem.*, 34 (1999) 451-465.
- [49] Y.S. Ho, A.E. Ofomaja, Pseudo-second-order model for lead ion sorption from aqueous solutions onto palm kernel fiber, *J. Hazard. Mater.*, 129 (2006) 137-142.
- [50] G.J. Mileski, J.A. Bumpus, M.A. Jurek, S.D. Aust, Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (1988) 2885-2889.
- [51] J.E. Lin, H.Y. Wang, R.F. Hickey, Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*, *Biotechnol. Bioeng.*, 35 (1990) 1125-1134.
- [52] G.V.B. Reddy, M.H. Gold, Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved, *Microbiology-Uk*, 146 (2000) 405-413.
- [53] G.V.B. Reddy, M.H. Gold, A two-component tetrachlorohydroquinone reductive dehalogenase system from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 257 (1999) 901-905.
- [54] A. Ricotta, R.F. Unz, J.M. Bollag, Role of a laccase in the degradation of pentachlorophenol, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57 (1996) 560-567.
- [55] M. Walter, L. Boul, R. Chong, C. Ford, Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi, *J. Environ. Manage.*, 71 (2004) 361-369.
- [56] M.A. Ullah, C.T. Bedford, C.S. Evans, Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolus versicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 (2000) 230-234.
- [57] D. Boyle, Effects of pH and cyclodextrins on pentachlorophenol degradation (mineralization) by white-rot fungi, *J. Environ. Manage.*, 80 (2006) 380-386.
- [58] L.F. González, V. Sarria, O.F. Sánchez, Degradation of chlorophenols by sequential biological-advanced oxidative process using *Trametes pubescens* and TiO₂/UV, *Bioresour. Technol.*, 101 (2010) 3493-3499.

- [59] D.F. Souza, S.C. da Costa, A.S. Dacome, C.G.M. de Souza, A. Bracht, R.M. Peralta, Pentachlorophenol removal by *Pleurotus Pulmonarius* in submerged cultures, Braz. Arch. Biol. Technol., 54 (2011) 357-362.
- [60] C. Mougin, A. Kollmann, C. Jolival, Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics, Biotechnol. Lett., 24 (2002) 139-142.
- [61] O. Rubilar, G. Feijoo, C. Diez, T.A. Lu-Chau, M.T. Moreira, J.M. Lema, Biodegradation of pentachlorophenol in soil slurry cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracoxyllum discolor*, Ind. Eng. Chem. Res., 46 (2007) 6744-6751.
- [62] O. Rubilar, G. Tortella, M. Cea, F. Acevedo, M. Bustamante, L. Gianfreda, M.C. Diez, Bioremediation of a Chilean Andisol contaminated with pentachlorophenol (PCP) by solid substrate cultures of white-rot fungi, Biodegradation, 22 (2011) 31-41.
- [63] M. Cea, M. Jorquera, O. Rubilar, H. Langer, G. Tortella, M.C. Diez, Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol by *Anthracoxyllum discolor* and its effect on soil microbial community, J. Hazard. Mater., 181 (2010) 315-323.
- [64] K. Fahr, H.G. Wetzstein, R. Grey, D. Schlosser, Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi, FEMS Microbiol. Lett. , 175 (1999) 127-132.
- [65] L. Sage, R. Steiman, F. Seigle-Murandi, J.-L. Benoit-Guyod, G. Merlin, Toxicity of pentachlorophenol for micromycetes isolated from freshwater sediments, J. Aquat. Ecosyst. Health, 2 (1993) 335-340.
- [66] R. Steiman, J.-L. Benoit-Guyod, F. Seigle-Murandi, L. Sage, A. Toe, Biodegradation of pentachlorophenol by micromycetes. II. Ascomycetes, basidiomycetes, and yeasts, Environ. Toxicol. Water Qual., 9 (1994) 1-6.
- [67] F. Seigle-Murandi, R. Steiman, J.L. Benoit-Guyod, Biodegradation potential of some micromycetes for pentachlorophenol, Ecotox. Environ. Safe., 21 (1991) 290-300.
- [68] F. Seigle-Murandi, R. Steiman, J.L. Benoit-Guyod, P. Guiraud, Biodegradation of pentachlorophenol by micromycetes. I. Zygomycetes, Environ. Toxicol. Water Qual., 7 (1992) 125-139.
- [69] J.A. van Leeuwen, B.C. Nicholson, K.P. Hayes, D.E. Mulcahy, Degradation of chlorophenolic compounds by *Trichoderma harzianum* isolated from Lake Bonney, south-eastern South Australia, Environ. Toxicol. Water Qual., 12 (1997) 335-342.
- [70] H. Chakroun, T. Mechichi, M.J. Martinez, A. Dhouib, S. Sayadi, Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds, Process Biochem., 45 (2010) 507-513.

- [71] H. Forootanfar, M.M. Movahednia, S. Yaghmaei, M. Tabatabaei-Sameni, H. Rastegar, A. Sadighi, M.A. Faramarzi, Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of *Paraconiothyrium variabile* and studying the role of its extracellular laccase, *J. Hazard. Mater.*, 209 (2012) 199-203.
- [72] A. Nakagawa, S. Osawa, T. Hirata, Y. Yamagishi, J. Hosoda, T. Horikoshi, 2,4-dichlorophenol degradation by the soil fungus *Mortierella* sp., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (2006) 525-527.
- [73] R. Szewczyk, P. Bernat, K. Milczarek, J. Dlugonski, Application of microscopic fungi isolated from polluted industrial areas for polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol reduction, *Biodegradation*, 14 (2003) 1-8.
- [74] R. Szewczyk, J. Dlugonski, Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63 (2009) 123-129.
- [75] M.B. Carvalho, I. Martins, M.C. Leitao, H. Garcia, C. Rodrigues, V.S. Romao, I. McLellan, A. Hursthouse, C.S. Pereira, Screening pentachlorophenol degradation ability by environmental fungal strains belonging to the phyla Ascomycota and Zygomycota, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36 (2009) 1249-1256.
- [76] M.B. Carvalho, S. Tavares, J. Medeiros, O. Nunez, H. Gallart-Ayala, M.C. Leitao, M.T. Galceran, A. Hursthouse, C.S. Pereira, Degradation pathway of pentachlorophenol by *Mucor plumbeus* involves phase II conjugation and oxidation-reduction reactions, *J. Hazard. Mater.*, 198 (2011) 133-142.
- [77] A. Abe, Y. Oda, K. Asano, T. Sone, *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers, *Mycologia*, 99 (2007) 714-722.
- [78] A. Abe, T. Sone, I.N. Sujaya, K. Saito, Y. Oda, K. Asano, F. Tomita, rDNA ITS sequence of *Rhizopus oryzae*: Its application to classification and identification of lactic acid producers, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (2003) 1725-1731.
- [79] K. Saito, A. Saito, M. Ohnishi, Y. Oda, Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes, *Arch. Microbiol.*, 182 (2004) 30-36.
- [80] M.J. Taherzadeh, M. Fox, H. Hjorth, L. Edebo, Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*, *Bioresour. Technol.*, 88 (2003) 167-177.
- [81] K. Ban, M. Kaieda, T. Matsumoto, A. Kondo, H. Fukuda, Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles, *Biochem. Eng. J.*, 8 (2001) 39-43.
- [82] M. Kaieda, T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto, H. Fukuda, Biodiesel fuel production from plant oil

catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent, J. Biosci. Bioeng., 88 (1999) 627-631.

[83] A. Bramorski, P. Christen, M. Ramirez, C.R. Soccol, S. Revah, Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates, Biotechnol. Lett., 20 (1998) 359-362.

[84] R. Nagarathnamma, P. Bajpai, Decolorization and detoxification of extraction-stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*, Appl. Environ. Microbiol., 65 (1999) 1078-1082.

[85] A.C. Freitas, F. Ferreira, A.M. Costa, R. Pereira, S.C. Antunes, F. Goncalves, T.A.P. Rocha-Santos, M.S. Diniz, L. Castro, I. Peres, A.C. Duarte, Biological treatment of the effluent from a bleached kraft pulp mill using basidiomycete and zygomycete fungi, Sci.Total Environ., 407 (2009) 3282-3289.

[86] T. Rocha-Santos, F. Ferreira, L. Silva, A.C. Freitas, R. Pereira, M. Diniz, L. Castro, I. Peres, A.C. Duarte, Effects of tertiary treatment by fungi on organic compounds in a kraft pulp mill effluent, Environ. Sci. Pollut. Res., 17 (2010) 866-874.

[87] H. Leon-Santiesteban, R. Bernal, F.J. Fernandez, A. Tomasini, Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenol-contaminated soil, J. Chem. Technol. Biotechnol., 83 (2008) 1394-1400.

[88] H. Leon-Santiesteban, M. Meraz, K. Wrobel, A. Tomasini, Pentachlorophenol sorption in nylon fiber and removal by immobilized *Rhizopus oryzae* ENHE, J. Hazard. Mater., 190 (2011) 707-712.

[89] K. Bourikas, J. Vakros, C. Kordulis, A. Lycourghiotis, Potentiometric mass titrations: Experimental and theoretical establishment of a new technique for determining the point of zero charge (PZC) of metal (hydr)oxides, J. Phys. Chem. B, 107 (2003) 9441-9451.

[90] Y.S. Ho, W.T. Chiu, C.C. Wang, Regression analysis for the sorption isotherms of basic dyes on sugarcane dust, Bioresour. Technol., 96 (2005) 1285-1291.

[91] B.V. Babu, S. Gupta, Adsorption of Cr(VI) using activated neem leaves: kinetic studies, Adsorption, 14 (2008) 85-92.

[92] D.K. Chattoraj, K.S. Birdi, Adsorption and the Gibbs surface excess, Plenum Press, New York, 1984.

[93] S. Hong, C. Wen, J. He, F. Gan, Y.S. Ho, Adsorption thermodynamics of Methylene Blue onto bentonite, J. Hazard. Mater., 167 (2009) 630-633.

[94] T. Mathialagan, T. Viraraghavan, Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass, Bioresour. Technol., 100 (2009) 549-558.

- [95] Y. Khambhaty, K. Mody, S. Basha, B. Jha, Biosorption of Cr(VI) onto marine *Aspergillus niger*: experimental studies and pseudo-second order kinetics, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25 (2009) 1413-1421.
- [96] S.S. Majumdar, S.K. Das, T. Saha, G.C. Panda, T. Bandyopadhyoy, A.K. Guha, Adsorption behavior of copper ions on *Mucor rouxii* biomass through microscopic and FTIR analysis, *Colloids Surf., B*, 63 (2008) 138-145.
- [97] R. Sanghi, N. Sankararamakrishnan, B.C. Dave, Fungal bioremediation of chromates: conformational changes of biomass during sequestration, binding, and reduction of hexavalent chromium ions, *J. Hazard. Mater.*, 169 (2009) 1074-1080.
- [98] N. Yee, L.G. Benning, V.R. Phoenix, F.G. Ferris, Characterization of metal-cyanobacteria sorption reactions: A combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 775-782.
- [99] S.B. Deng, Y.P. Ting, Characterization of PEI-modified biomass and biosorption of Cu(II), Pb(II) and Ni(II), *Water Res.*, 39 (2005) 2167-2177.
- [100] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, Introduction to spectroscopy : a guide for students of organic chemistry, 3rd ed., Harcourt College Publishers, Fort Worth, 2001.
- [101] J.P. DiVincenzo, D.L. Sparks, Sorption of the neutral and charged forms of pentachlorophenol on soil: Evidence for different mechanisms, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 40 (2001) 445-450.
- [102] Y.J. Xue, H.B. Hou, S.J. Zhu, Adsorption removal of reactive dyes from aqueous solution by modified basic oxygen furnace slag: Isotherm and kinetic study, *Chem. Eng. J.*, 147 (2009) 272-279.
- [103] L. Luo, L.P. Lou, X.Y. Cui, B.B. Wu, J.A. Hou, B. Xun, X.H. Xu, Y.X. Chen, Sorption and desorption of pentachlorophenol to black carbon of three different origins, *J. Hazard. Mater.*, 185 (2011) 639-646.
- [104] N.S. Kumar, K. Min, Phenolic compounds biosorption onto *Schizophyllum commune* fungus: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling, *Chem. Eng. J.*, 168 (2011) 562-571.
- [105] M. Yurdakoc, Y. Seki, S. Karahan, K. Yurdakoc, Kinetic and thermodynamic studies of boron removal by Siral 5, Siral 40, and Siral 80, *J. Colloid Interface Sci.*, 286 (2005) 440-446.
- [106] B. Koumanova, P. Peeva, S.J. Allen, K.A. Gallagher, M.G. Healy, Biosorption from aqueous solutions by eggshell membranes and *Rhizopus oryzae*: equilibrium and kinetic studies, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77 (2002) 539-545.
- [107] S.K. Das, J. Bhowal, A.R. Das, A.K. Guha, Adsorption behavior of rhodamine B on *Rhizopus oryzae* biomass, *Langmuir*, 22 (2006) 7265-7272.

- [108] S.K. Das, A.R. Das, A.K. Guha, A study on the adsorption mechanism of mercury on *Aspergillus versicolor* biomass, *Environ. Sci. Technol.*, 41 (2007) 8281-8287.
- [109] L. Ramrakhiani, R. Majumder, S. Khowala, Removal of hexavalent chromium by heat inactivated fungal biomass of *Termitomyces clypeatus*: Surface characterization and mechanism of biosorption, *Chem. Eng. J.*, 171 (2011) 1060-1068.
- [110] S. Ahmady-Asbchin, Y. Andres, C. Gerente, P. Le Cloirec, Biosorption of Cu(II) from aqueous solution by *Fucus serratus*: Surface characterization and sorption mechanisms, *Bioresour. Technol.*, 99 (2008) 6150-6155.
- [111] J.L. Wang, Y. Qian, N. Horan, E. Stentiford, Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass, *Bioresour. Technol.*, 75 (2000) 157-161.
- [112] B. Antizar-Ladislao, N.I. Galil, Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer, *Water Res.*, 38 (2004) 267-276.
- [113] S.B. Deng, R. Ma, Q. Yu, J. Huang, G. Yu, Enhanced removal of pentachlorophenol and 2,4-D from aqueous solution by an aminated biosorbent, *J. Hazard. Mater.*, 165 (2009) 408-414.
- [114] M. Tsezos, J.P. Bell, Comparison of the biosorption and desorption of hazardous organic pollutants by live and dead biomass, *Water Res.*, 23 (1989) 561-568.
- [115] Y. Arcand, J. Hawari, S.R. Guiot, Solubility of Pentachlorophenol in aqueous solutions: The pH effect, *Water Res.*, 29 (1995) 131-136.
- [116] M. Sathishkumar, A.R. Binupriya, D. Kavitha, R. Selvakumar, R. Jayabalan, J.G. Choi, S.E. Yun, Adsorption potential of maize cob carbon for 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions: Equilibrium, kinetics and thermodynamics modeling, *Chem. Eng. J.*, 147 (2009) 265-271.
- [117] Q.S. Liu, T. Zheng, P. Wang, J.P. Jiang, N. Li, Adsorption isotherm, kinetic and mechanism studies of some substituted phenols on activated carbon fibers, *Chem. Eng. J.*, 157 (2010) 348-356.
- [118] B. Volesky, Biosorption and me, *Water Res.*, 41 (2007) 4017-4029.
- [119] J.W. Biggar, M.W. Cheung, Adsorption of picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) on Pinoche, Ephrata, and Palouse soils: a thermodynamic approach to the adsorption mechanism., *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 37 (1973) 863-868.
- [120] R. Han, J. Zhang, P. Han, Y. Wang, Z. Zhao, M. Tang, Study of equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters about methylene blue adsorption onto natural zeolite, *Chem. Eng. J.*, 145 (2009) 496-504.

- [121] A.R.C. Escobosa, J.A.L. Figueroa, J.F.G. Corona, K. Wrobel, Effect of *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* on the degradation of humic acid associated with Cu, Pb, and Ni: an in vitro study, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 2267-2276.
- [122] K.L. Lee, H.R. Buckley, C.C. Campbell, An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*, *Sabouraudia*, 13 (1975) 148-153.
- [123] A. Tomasini, V. Flores, D. Cortes, J. Barrios-Gonzalez, An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol, *World J. Microbiol. Biotechnol.* , 17 (2001) 201-205.
- [124] D.R. Knapp, Introduction: Uses of Analytical Derivatization, in: *Handbook of analytical derivatization reactions*, Wiley. com, 1979.
- [125] F. Orata, Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, in: M.A. Mohd (Ed.) *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, InTech, Chapters published 2012.
- [126] T.Y. Shi, T. Tang, K. Qian, F. Wang, J.Q. Li, Y.S. Cao, High-performance liquid chromatographic method for determination of amino acids by precolumn derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride, *Anal. Chim. Acta*, 654 (2009) 154-161.
- [127] R. Thippeswamy, K.G.M. Gouda, D.H. Rao, A. Martin, L.R. Gowda, Determination of theanine in commercial tea by liquid chromatography with fluorescence and diode array ultraviolet detection, *J. Agric. Food. Chem.*, 54 (2006) 7014-7019.
- [128] APHA, AWWA, WEF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1998.
- [129] A. Toledo-Cervantes, M. Morales, E. Novelo, S. Revah, Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*, *Bioresour. Technol.*, 130 (2013) 652-658.
- [130] C. Quintas, J.S. Leyva, R. Sotoca, M.C. Loureiro-Dias, J.M. Peinado, A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements, *Int. J. Food Microbiol.*, 100 (2005) 125-130.
- [131] S.L. Boström, Johansson.Rg, Effects of pentachlorophenol on enzymes involved in energy metabolism in liver of eel, *Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.*, 41 (1972) 359-369.
- [132] M.B. Carvalho, I. Martins, J. Medeiros, S. Tavares, S. Planchon, J. Renaut, O. Nunez, H. Gallart-Ayala, M.T. Galceran, A. Hursthouse, C.S. Pereira, The response of *Mucor plumbeus* to pentachlorophenol: A toxicoproteomics study, *J. Proteomics*, 78 (2013) 159-171.
- [133] B. Ghosh, R.R. Ray, Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: a review, *J Appl Sci*, 11 (2011) 2470-2486.

- [134] S. Bhargava, Utilization of amino acids in mixtures by three storage rot fungi, *Nat. Inst. Sci. India Proc.*, 37 (1971) 46-52.
- [135] R.S. Greenberg, R.A. Ledford, Deamination of glutamic and aspartic acids by *Geotrichum candidum* *J. Dairy Sci.*, 62 (1979) 368-372.
- [136] E.H. Ali, Effects of some amino acids on ammonia secretion and extracellular protease activity by three Oomycetes in synthetic medium with or without glucose, *Mycobiology*, 33 (2005) 23-29.
- [137] ChemSpider, Pentachloroanisole, Properties, Predicted-EPISuite (Predicted data is generated using the US Environmental Protection Agency's EPISuite™), <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14993.html?rid=3edff2f8-1db9-4654-be7d-41ed1fafd709>.
- [138] B.C. Okeke, J.E. Smith, A. Paterson, I.A. Watsoncraik, Aerobic metabolism of pentachlorophenol by spent sawdust culture of “Shiitake” mushroom (*Lentinus edodes*) in soil, *Biotechnol. Lett.*, 15 (1993) 1077-1080.
- [139] A.J. Cserjesi, E.L. Johnson, Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*, *Can. J. Microbiol.*, 18 (1972) 45-&.
- [140] C. Laugero, C. Mougín, J.C. Sigoillot, S. Moukha, M. Asther, Comparison of static and agitated immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* for the degradation of pentachlorophenol and its metabolite pentachloroanisole, *Can. J. Microbiol.*, 43 (1997) 378-383.
- [141] M.L. Alvarez-Rodríguez, L. López-Ocana, J.M. López-Coronado, E. Rodríguez, M.J. Martínez, G. Larriba, J.J.R. Coque, Cork taint of wines: Role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O methylation of 2,4,6-trichlorophenol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2002) 5860-5869.
- [142] J. Dai, A.L. Sloat, M.W. Wright, R.A. Manderville, Role of phenoxyl radicals in DNA adduction by chlorophenol xenobiotics following peroxidase activation, *Chem. Res. Toxicol.*, 18 (2005) 771-779.
- [143] P.H. Lin, D.K. La, P.B. Upton, J.A. Swenberg, Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol, *Carcinogenesis*, 23 (2002) 365-369.
- [144] P.H. Lin, J. Nakamura, S. Yamaguchi, D.K. La, P.B. Upton, J.A. Swenberg, Induction of direct adducts, apurinic/apyrimidinic sites and oxidized bases in nuclear DNA of human HeLaS3 tumor cells by tetrachlorohydroquinone, *Carcinogenesis*, 22 (2001) 635-639.
- [145] B. Vanommen, A.E.P. Adang, L. Brader, M.A. Posthumus, F. Muller, P.J. Vanbladeren, The Microsomal Metabolism of Hexachlorobenzene - Origin of the covalent binding to protein, *Biochem. Pharmacol.*, 35 (1986) 3233-3238.

Capítulo 7

- [146] D.L. Ning, H. Wang, Involvement of Cytochrome P450 in Pentachlorophenol Transformation in a White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Plos One, 7 (2012).
- [147] A. Longoria, R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, Chloroperoxidase-mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds, Chemosphere, 72 (2008) 485-490.
- [148] S. Pallerla, R.P. Chambers, Reactor development for biodegradation of pentachlorophenol, Catal. Today, 40 (1998) 103-111.
- [149] G.Y. Kang, D.K. Stevens, Degradation of pentachlorophenol in bench-scale bioreactors using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* Hazard. Waste Hazard. Mater., 11 (1994) 397-410.
- [150] S.S. Shim, K. Kawamoto, Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor, Water Res., 36 (2002) 4445-4454.
- [151] C. Rüttimann-Johnson, R.T. Lamar, Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes, Appl. Environ. Microbiol., 62 (1996) 3890-3893.
- [152] C. Kazunga, M.D. Aitken, A. Gold, Primary product of the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of pentachlorophenol, Environ. Sci. Technol., 33 (1999) 1408-1412.

8 Anexos

ANEXO A. La cuantificación de PCF en los experimentos de biosorción se realizó por HPLC-DAD a una longitud de onda (λ) de 303 nm. La curva de calibración se construyó con seis niveles de PCF dentro de un intervalo lineal. Las concentraciones de PCF utilizadas en la calibración fueron de 1 a 12 mg L⁻¹. El gráfico A1 muestra la curva de calibración para la cuantificación de PCF en los experimentos de biosorción.

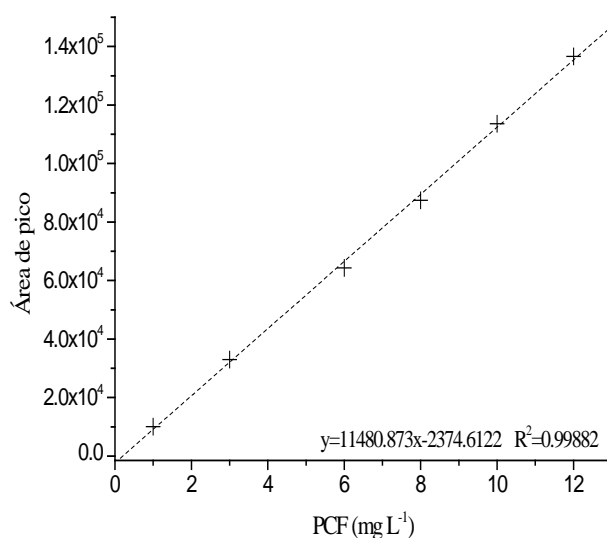


Gráfico A1 Curva de calibración utilizada para la cuantificación de PCF en los experimentos de biosorción

ANEXO B. Gráfico que representa el efecto del pH sobre la velocidad de sorción de PCF en la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE. Los resultados experimentales fueron ajustados por regresión no lineal al modelo cinético de pseudo-primer orden de Lagergren.

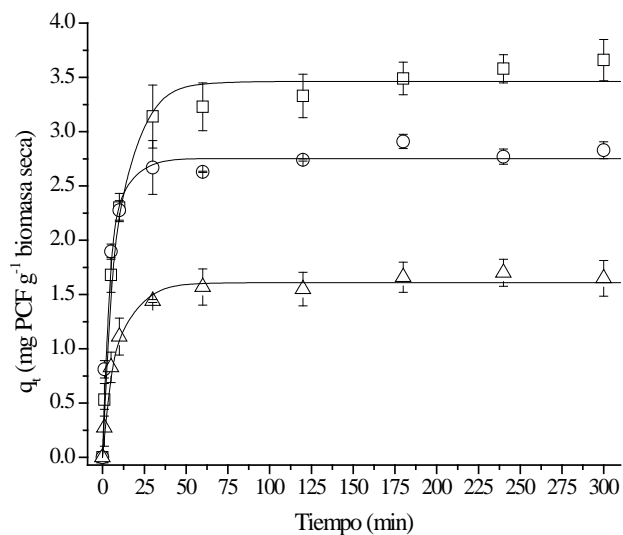


Gráfico B1 Cinética de sorción de PCF en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE en función del pH. Resultados experimentales fueron ajustados al modelo de Lagergren. (□) pH 5.0; (○) pH 6.0 y (Δ) pH 8.0.

ANEXO C. Gráficos que representan la capacidad de sorción de PCF por la biomasa seca de *R. oryzae* ENHE en función del pH. Los resultados experimentales se ajustaron por regresión no lineal a las isothermas de Freundlich (gráfico C1) y Langmuir (gráfico C2).

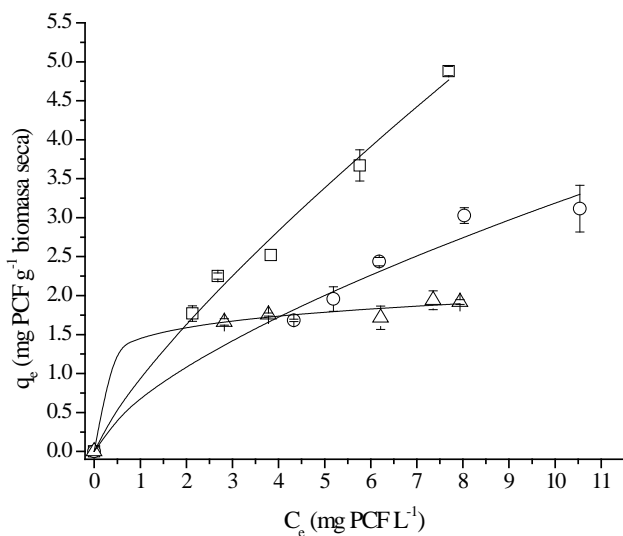


Gráfico C1 Capacidad de sorción de PCF experimental en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE ajustada con la isoterma de Freundlich. (□) pH 5.0; (○) pH 6.0 y (Δ) pH 8.0.

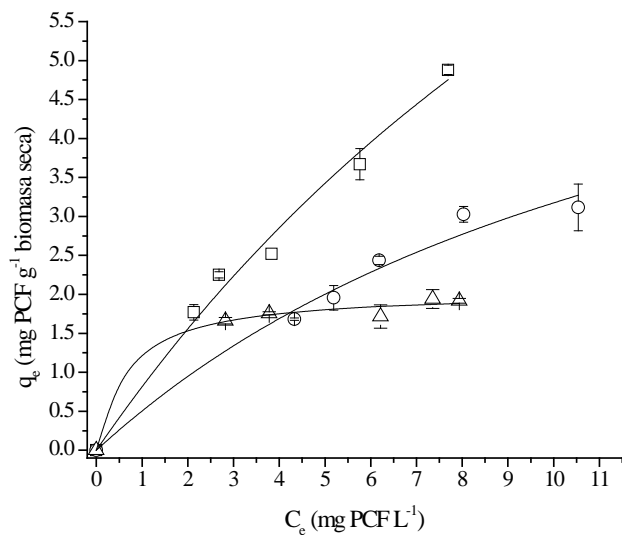


Gráfico C2 Capacidad de sorción de PCF experimental en biomasa seca de *R. oryzae* ENHE ajustada con la isoterma de Langmuir. (□) pH 5.0; (○) pH 6.0 y (Δ) pH 8.0.

ANEXO D. Gráficos que representan la capacidad de sorción de PCF por la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE. Las capacidades de sorción de PCF experimentales se ajustaron por regresión no lineal a la isoterma de Freundlich a pH 3.5 (Gráfico D1) y a la isoterma de Langmuir a pH 7.5 (Gráfico D2).

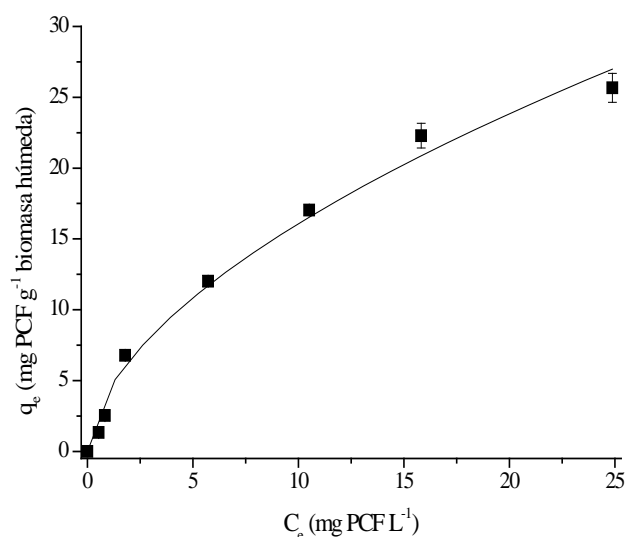


Gráfico D1 Capacidad de sorción de PCF de la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 3.3. Datos experimentales ajustados con la isoterma de Freundlich.

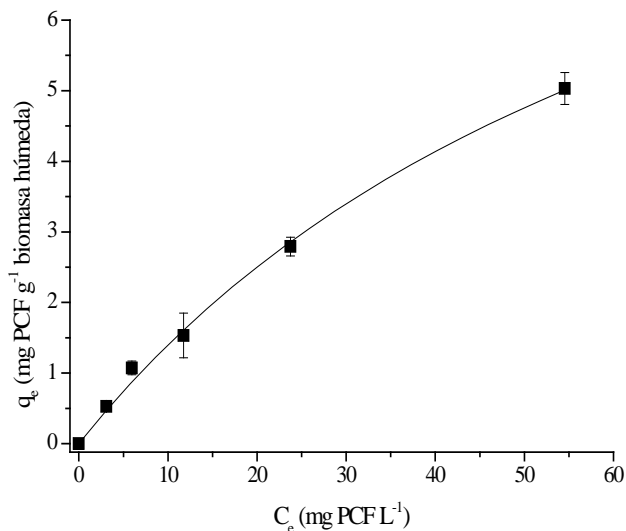


Gráfico D2 Capacidad de sorción de PCF de la biomasa húmeda de *R. oryzae* ENHE a pH 7.5. Datos experimentales ajustados con la isoterma de Langmuir.

ANEXO E. Cuantificación de CO₂ y O₂

La cuantificación del CO₂ se llevó a cabo por GC-TCD utilizando el método de estándar externo. Las proporciones de CO₂ utilizadas en la calibración fueron cinco. Cada punto en la curva de calibración, fue un volumen de CO₂ grado analítico disuelto en 125 mL de aire. Los volúmenes de CO₂ utilizados en la calibración fueron de 0.05 mL a 1 mL. El gráfico E1 muestra la curva de calibración obtenida con los diferentes volúmenes de CO₂ en aire.

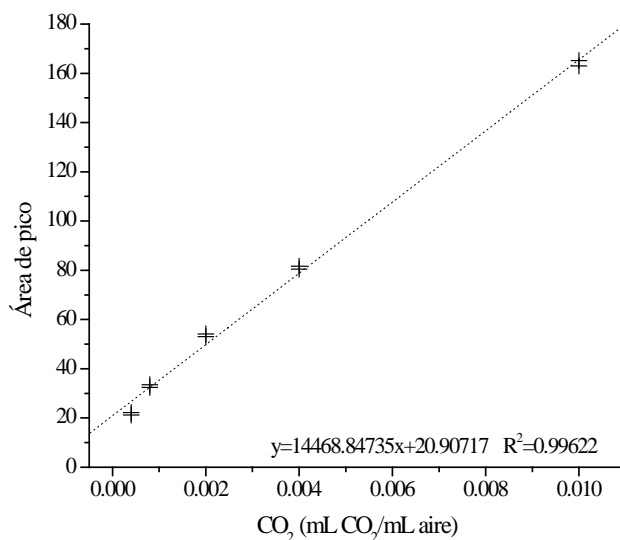


Gráfico E1 Curva de calibración utilizada para la cuantificación del CO₂ producido en los cultivos de *R. oryzae* ENHE

La cuantificación del O₂ en los cultivos, se realizó indirectamente al conocer las áreas de los picos de los principales gases en la respiración de *R. oryzae* ENHE. El N₂ se utilizó como gas de referencia, ya que su proporción en las muestras fue constante durante todo el análisis. La ecuación E1 utilizada para estimar la proporción de O₂ en el aire de las muestras de los cultivos fue:

$$O_2 \left(\frac{mL O_2}{mL aire} \right) = \frac{\text{área de pico del } O_2}{\text{Suma de área de picos de } CO_2, O_2 \text{ y } N_2} \quad \text{Ec. E1}$$

ANEXO F. Calibración, PCF e intermediarios

La cuantificación del PCF y los intermediarios metabólicos identificados se realizó por GC-ECD por el método del estándar interno. Los compuestos detectados fueron las versiones acetiladas de los estándares utilizados. El gráfico F1 muestra los cromatogramas obtenidos durante la calibración por estándar interno (PCNB).

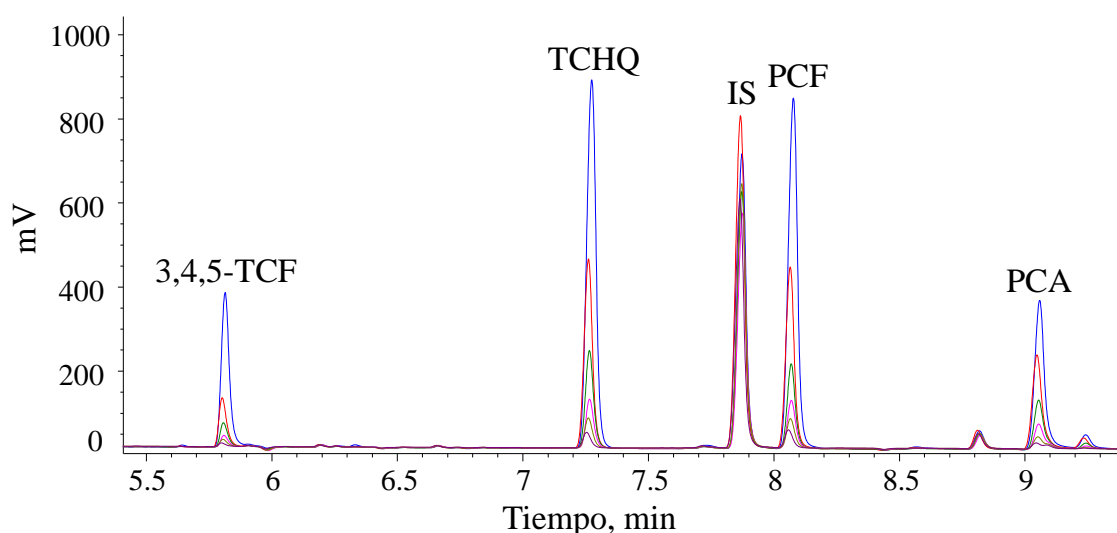


Gráfico F1 Cromatogramas que representan la calibración realizada en base a las formas acetiladas del 3,4,5-TCF, TCHQ y PCF.

Capítulo 8

La calibración se realizó con cinco niveles de cada uno de los estándares en base a su masa. La tabla F1 muestra los compuestos clorados que se utilizaron para la calibración, el intervalo de masa donde la respuesta del detector fue lineal, así como los parámetros estadísticos del ajuste de regresión lineal obtenidos del análisis estadístico.

Tabla F1. Compuestos clorados utilizados para la calibración por el método de ISTD.

Compuesto	t_R (min)	Intervalo lineal (ng)	m	b	R^2
3,4,5-TCF	5.791	50-600	1.31E-02	4.9E-03	0.9981
TCHQ	7.249	30.5-366	8.92E-02	3.5E-02	0.9934
PCF	8.056	35-420	4.57E-02	1.2E-02	0.9979
PCA	9.043	31-372	2.86E-02	3.7E-03	0.9979

ANEXO G. Calibración, Glucosa (Glc)

La cuantificación de la Glc se realizó por HPLC-RI por el método de estándar externo. Para la cuantificación de Glc se utilizaron cinco niveles dentro de un intervalo lineal. Las concentraciones de Glc utilizadas para la calibración fueron de 0.1 a 6 g L⁻¹. El gráfico G1 muestra los cromatogramas de los estándares así como la curva de calibración que se utilizó para la cuantificación de la Glc residual presente en el medio de cultivo.

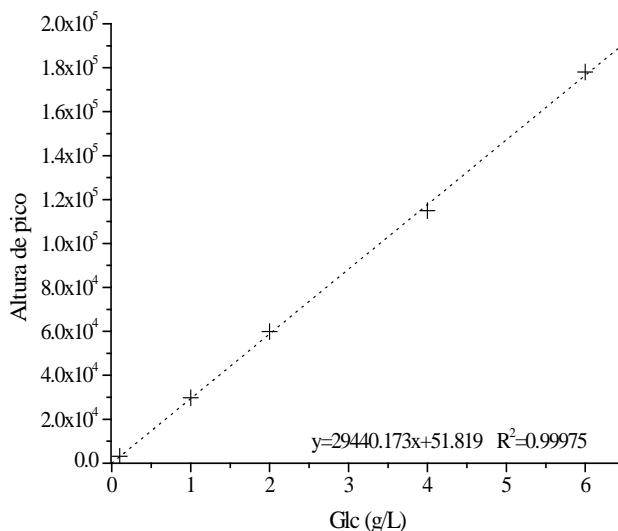


Gráfico G1 Curva de calibración utilizada para la cuantificación de Glc presente en el medio de cultivo.

ANEXO H. Calibración, ácido glutámico (Glu)

El Glu residual en el medio de cultivo se cuantificó por HPLC-DAD utilizando el método de estándar externo. El rendimiento de reacción de derivatización del Glu con OPA varió entre el 98 y 100%. Los niveles que se utilizaron para la calibración fueron seis dentro de un intervalo lineal. Las concentraciones de Glu utilizadas para dicha calibración fueron de 4.09 a 24.58 mg L⁻¹. El gráfico H1 muestra la curva de calibración obtenida con los derivados de Glu.

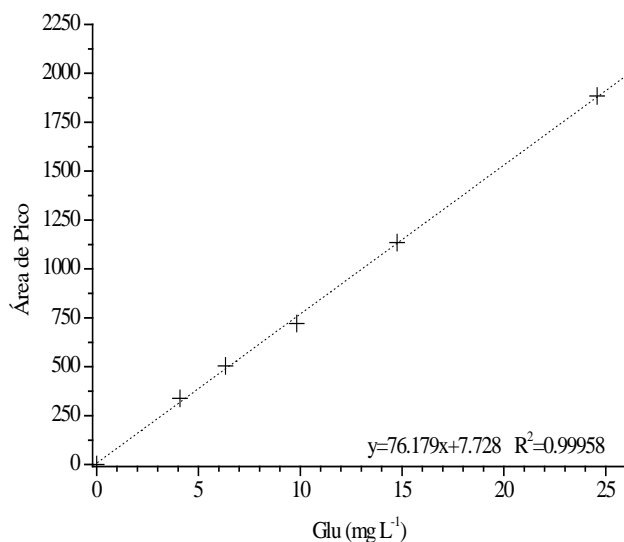


Gráfico H1 Curva de calibración obtenida a partir de los derivados de Glu producidos con OPA.

ANEXO I. Calibración, amonio (NH₄⁺)

El NH₄⁺ en el medio de cultivo, se cuantificó espectrofotométricamente a 640 nm por el método de estándar externo. Como estándar externo se utilizó el NH₄⁺ de NH₄Cl. Las concentraciones de NH₄⁺ utilizadas para la calibración fueron de 0.04 mg L⁻¹ a 0.5 mg L⁻¹. El gráfico I1 muestra la curva de calibración construida con seis niveles de estándar de NH₄⁺.

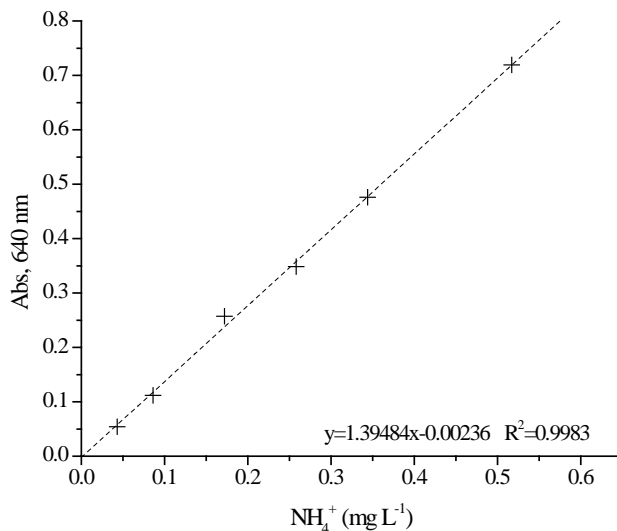


Gráfico I1 Curva de calibración para la cuantificación de NH₄⁺

ANEXO J. Calibración, nitrato (NO₃⁻)

La cuantificación de los nitratos se realizó por UV a 220 nm con celdas de cuarzo por el método de estándar externo. Como estándar externo se utilizó NO₃⁻ proveniente de NaNO₃. Las concentraciones de NO₃⁻ utilizadas para la calibración fueron de 0.7 μg mL⁻¹ a 7.3 μg mL⁻¹. El gráfico J1 muestra la curva de calibración construida con seis niveles de estándar de NO₃⁻.

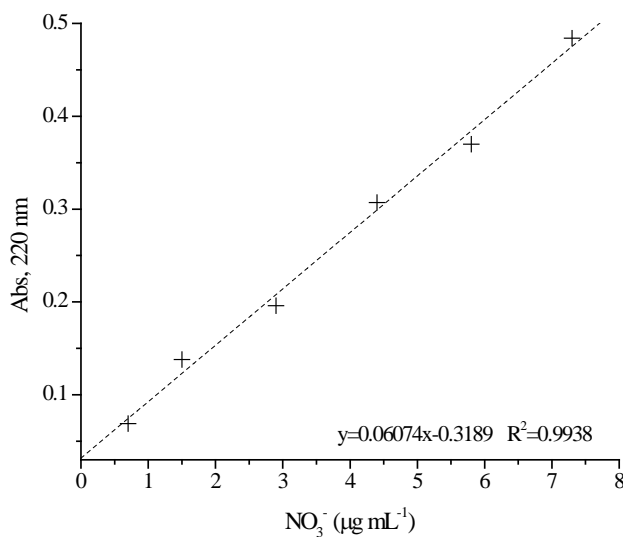


Gráfico J1 Curva de calibración para la cuantificación de NO₃⁻

ANEXO K. Gráfico que representa los cambios de absorbancia en los espectros de absorción del PCF durante las pruebas de eliminación abiótica del PCF.

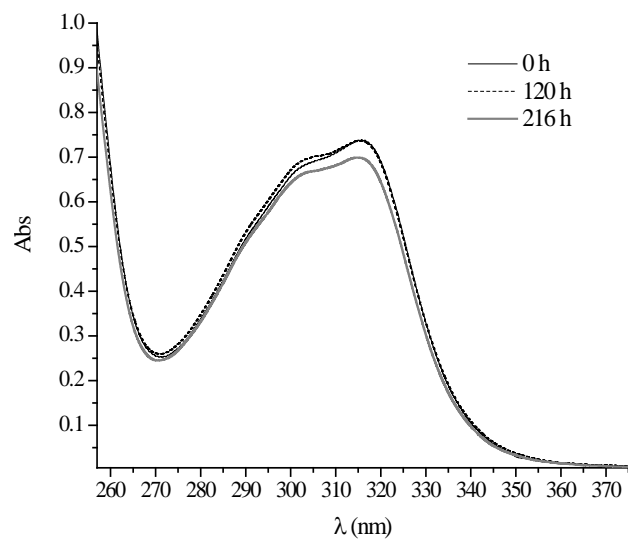


Gráfico Hans Espectros de absorción de PCF obtenidos en la cinética de eliminación abiótica de PCF.