

**Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa**



**Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

**Casa abierta al tiempo
División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**ESTUDIOS DE TOXICIDAD Y BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS
MODELO EN HONGOS FILAMENTOSOS**

Presenta:

I.B.Q. Yuri Castro Riquelme

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Director

Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor

**T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

México, D.F. Octubre 2008

Contenido

	Contenido	i
	Agradecimientos	iii
	Resumen	iv
1.	Introducción	1
2	Revisión Bibliográfica	3
2.1.	Biodegradación microbiana de xenobióticos	3
2.2.	Biodegradación de hidrocarburos por hongos filamentosos	7
2.3.	Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos	25
2.4.	Factores que afectan la biodegradación	27
2.5.	Pruebas de biodegradación y toxicidad de hidrocarburos	30
3.	Definición del problema	33
4.	Hipótesis de trabajo	35
5.	Objetivos	36
5.1.	Objetivo general	36
5.2.	Objetivos particulares	36
6	Materiales y métodos	37
6.1.	Material	37
6.2.	Microorganismos	37
6.3.	Medios de cultivo	38
6.3.1.	Medio PDA	38
6.3.2.	Medio de cultivo para fermentación líquida	38
6.4.	Desarrollo del inóculo	39
6.5.	Conteo de esporas	39
6.6.	Conservación de las cepas	40
6.7.	Pruebas de toxicidad en caja Petri	41
6.8.	Pruebas de toxicidad en medio líquido	43
6.9.	Tratamiento de las muestras	45
6.9.1.	Análisis de muestras	45
6.10.	Análisis químicos	45
6.10.1.	Glucosa	45
6.10.2.	Hexadecano	47
6.10.2.1.	Preparación de la curva patrón	47
6.10.2.2.	Preparación de las muestras	48
6.10.3.	Fenantreno	48
6.10.3.1.	Preparación de la curva patrón	48
6.10.3.2.	Tratamiento de las muestras	48
6.10.4.	Beta-naftol	49
6.10.4.1.	Preparación de la curva patrón	49
6.10.4.2.	Tratamiento de las muestras	49
6.10.5.	Cuantificación de biomasa por el método gravimétrico	49
6.10.6.	Tratamiento de los resultados	50
6.10.6.1.	Caja Petri	50
6.10.6.2.	Fermentación en tubo de ensayo	50
7.	Resultados y discusión	53

7.1.	Estudios de toxicidad en caja Petri	53
7.1.1.	Efecto del hexadecano	53
7.1.2.	Efecto del fenantreno	54
7.1.3.	Efecto del beta-naftol	55
7.2.	Estudios de toxicidad en tubo de ensayo	58
7.2.1.	Estudios de toxicidad de hexadecano, fenantreno y beta-naftol en cultivos mixtos	58
7.2.1.1.	Consumo de glucosa	58
7.2.1.2.	Producción de biomasa	59
7.2.2.	Estudios de toxicidad en hexadecano, fenantreno y beta-naftol en cultivos axenicos	60
7.2.2.1.	Estudios en hexadecano	61
7.2.2.1.1.	Consumo de glucosa	61
7.2.2.1.2.	Consumo de hexadecano	61
7.2.2.1.3.	Producción de biomasa	62
7.2.2.2.	Estudios en fenantreno	64
7.2.2.2.1.	Consumo de glucosa	64
7.2.2.2.2.	Consumo de fenantreno	64
7.2.2.2.3.	Producción de biomasa	65
7.2.2.3..	Estudios en beta-naftol	67
7.2.2.3.1.	Consumo de glucosa	67
7.2.2.3.2.	Consumo de beta-naftol	67
7.2.2.3.3.	Producción de biomasa	68
8.	Conclusiones	70
9.	Recomendaciones	71
10.	Referencias bibliográficas	72
11.	Anexo	82
	Propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos estudiados	

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma Metropolitana por la formación que me dio durante la licenciatura y la maestría, formación que ha sido básica y decisiva en mi formación profesional. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Mexicano del Petróleo por las becas otorgadas para realizar este trabajo. Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas quien aceptó ser mi director de tesis y quien con su paciencia me guió durante la maestría e hizo mas fácil este camino, al Dr. Ernesto Favela, maestro y amigo de muchos años, quien me apoyó y guió durante mi formación de Licenciatura y Maestría.

A mis padres y hermana por su gran soporte durante mi licenciatura y maestría, porque fueron un gran apoyo en momentos difíciles, a mis maestros de la licenciatura, y maestría. A mis compañeros y amigos de la PP4 y de la Universidad Autónoma Metropolitana por ser un continuo aliciente para continuar con mi trabajo y superarme día a día. Muy en especial a Gerardo Saucedo, Sergio Huerta, Areli Prado, Juan Romano, Cristóbal Aguilar, Jean Philipe, Bibiana Rodríguez, Tania Volke, Martha Helena Ramírez, Marcos Meneses, Luciano Aguilera, Alejandro Téllez y Keiko Shirai amigos entrañables de muchas horas de trabajo.

A Martha Celia Herrera Díaz, mi terapeuta, sin cuyo trabajo no hubiera retomado este proyecto. A Paola, Lulú y Laura.

A todos con infinito amor ternura y esperanza.

Resumen

Se ensayó la toxicidad de tres hidrocarburos (hexadecano, fenantreno y beta-naftol) en cinco cepas de hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus sp. B-03*, *Aspergillus sp A-01*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Penicillium pinophilum*).

La primera serie de experimentos se realizaron en caja Petri, se asperjaron los tres hidrocarburos en cajas Petri con PDA y se inocularon por piquete cuatro colonias en cada caja Petri. Se probaron un control sólo con PDA e inóculo, otro con PDA, inóculo y el disolvente del hidrocarburo y otros tres con diferentes concentraciones del hidrocarburo (0.0162 mg/cm², 0.162 mg/cm² y 1.62 mg/cm²).

El hexadecano no presentó efecto tóxico sobre las cepas ensayadas, el fenantreno disminuyó la velocidad de crecimiento radial y el beta-naftol solo permitió el crecimiento en la concentración más baja (0.0162 mg/cm²) afectando la velocidad de crecimiento radial.

La segunda serie de experimentos se hicieron en tubo de ensayo de 30 ml. Se usaron 5 ml de medio de cultivo con glucosa (10 g/L), se adicionó el hidrocarburo (se probaron tres concentraciones, 0.005 g/L, 0.05 g/L y 0.5 g/L) y se inoculó con el cultivo mixto, se incubó con agitación en un shaker a 30 ° C durante 5 días, al final de la fermentación se midió la glucosa y la biomasa.

No se observó efecto tóxico del hexadecano ni del fenantreno en ninguna de las tres concentraciones ensayadas, no así del beta-naftol, que en la concentración más alta no permitió el crecimiento del cultivo mixto.

La tercera serie de experimentos fue igual a la segunda, se probaron las cepas por separado con la concentración intermedia (0.05 g/L), se incubó con agitación en un shaker a 30 ° C durante 14 días, esta vez se midió glucosa, biomasa, el hexadecano por cromatografía de gases, el fenentraeno y beta-naftol por HPLC. En ninguna de las cinco cepas por separado en presencia de hexadecano se observó un efecto tóxico, en presencia de fenantreno

tampoco se observó un efecto tóxico, en beta- naftol la cepa que experimentó un efecto tóxico fue *P. chrysosporium* (no hubo crecimiento), el resto de las cepas experimentaron un efecto tóxico en la disminución de la biomasa.

El orden de toxicidad de los hidrocarburos es el siguiente, hexadecano es el menos tóxico, de ahí sigue fenantreno, el más tóxico es beta-naftol, tanto en caja Petri como en tubo de ensayo. La importancia de estos estudios radica en demostrar la relación entre estructura química y toxicidad de los hidrocarburos modelo sobre el crecimiento de hongos filamentosos, ya que en ocasiones la persistencia de un hidrocarburo se debe a su toxicidad.

1. Introducción

En el presente trabajo se evaluó la toxicidad y la biodegradación de tres hidrocarburos (hexadecano, fenantreno y beta-naftol) a tres diferentes concentraciones en presencia de cinco hongos filamentosos *Aspergillus niger* (ATCC 9642), *Aspergillus sp* B-03, *Aspergillus sp* A-01, *Phanerochaete chrysosporium* (H-298) y *Penicillium pinophilum* (ATCC11797).

Los hidrocarburos se probaron primero asperjándolos en cajas Petri con PDA, y después en medio líquido con tubos de ensayo en agitación.

Los estudios se llevaron a cabo con glucosa como otra fuente de carbono, la finalidad más que ver la biodegradación es estudiar la toxicidad de los hidrocarburos frente a los hongos, ya que muchas veces la biodegradación no se puede llevar a cabo por la toxicidad del hidrocarburo más que por la persistencia del mismo.

La finalidad es también encontrar las concentraciones en que los hidrocarburos son tóxicos así como la toxicidad que presentan los tres hidrocarburos en función de su estructura química sea esta alifática, aromática o aromática polar.

Este trabajo consta de un capítulo de revisión bibliográfica donde se revisan artículos sobre biodegradación de hidrocarburos por hongos filamentosos, definición del problema, donde se sitúa el problema, la hipótesis de trabajo donde se centran las principales hipótesis evaluadas durante la tesis, los objetivos que ayudan a centrar el alcance del trabajo, la estrategia general donde se define cómo se aborda el problema experimental, materiales y métodos donde se exponen las principales metodologías de trabajo, que en este caso fueron cultivos en caja Petri y fermentación en líquido.

En el capítulo de resultados y discusión se reportan y analizan los resultados tanto de caja Petri como de tubo de ensayo, el análisis termina con las conclusiones generales. En la

parte de recomendaciones se dan algunas ideas para profundizar estos experimentos en un futuro.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Biodegradación microbiana de xenobióticos

Con la aparición del hombre en la tierra se empezó a dar una modificación del medio ambiente por parte del mismo, esta modificación se aceleró con la evolución de la especie humana, al producirse la revolución industrial se aumenta aun más esta tasa de cambio, una de las expresiones de este cambio es la contaminación, el ser humano produce compuestos que no se encuentran en la naturaleza (xenobióticos) e incrementa algunos de los que se encuentran (CO_2 e hidrocarburos). En un intento de remediar este problema se desarrollan tecnologías de descontaminación (tratamiento de efluentes, remediación de sitios, desarrollo de tecnologías menos contaminantes), de estas tecnologías unas de las más importantes es el uso de sistemas biológicos para biodegradar los xenobióticos, para esto es necesario el estudio de las interacciones de estos compuestos orgánicos con los seres vivos, principalmente microorganismos.

Cuando un compuesto orgánico entra en contacto con un microorganismo experimenta una biodegradación primaria que lo convierte en otros compuestos, si estas biodegradaciones continúan pueden llegar a convertirlo en CO_2 y agua, en este caso se habla de mineralización, Cuando un compuesto químico presenta resistencia a cualquier grado de biodegradación se habla de persistencia. En general los compuestos biogénicos son fáciles de biodegradar y los xenobióticos más difíciles de biodegradar (Grady, 1985).

El cometabolismo es una forma de biodegradación en la cual un compuesto es metabolizado simultáneamente junto con otro, y la degradación del segundo (cosustrato) depende de la presencia del primer sustrato, este mecanismo tiene mayor parecido a los que se presentan en la naturaleza ya que en la naturaleza no se hayan sustratos puros sino complejas mezclas de los mismos, los xenobióticos se degradan muchas veces por cometabolismo (Singleton, 1994 y Venkataramani y Ahlert, 1985).

Las encargadas de realizar la biodegradación en un microorganismo son las enzimas, estas proteínas son de varios tipos, tales como: monoxigenasas, dioxigenasas, ligninasas, lignino peroxidasas, polifenol oxidasas y lacasas según el sustrato sobre el que van a actuar (Singleton, 1994). Actualmente, se han estudiado muchas enzimas y la forma en que actúan sobre sus sustratos.

En general las tasas de biodegradación de compuestos en el medio ambiente son más lentas que en el laboratorio, por eso la contaminación es un factor tan crítico, la tasa de producción de contaminantes es mucho más alta que la de biodegradación en algunas ocasiones. Por tanto conocer los factores que afectan la tasa de degradación es de suma importancia, el gran problema es que muchos de estos factores pueden controlarse en el laboratorio, mas no así en el medio ambiente. Dentro de los factores que afectan la tasa de degradación de los hidrocarburos aromáticos polinucleados (de ahora en adelante llamados HAP) están las que se describen a continuación (Tang *et al*, 2005).

Factores que afectan la tasa de biodegradación microbiana de los HAP (Tang Y. *et al*;2005).

1.- Poblaciones degradadoras de hidrocarburos aromáticos polinucleados.

- Los degradadores de HAP sólo representan una pequeña fracción del total de las poblaciones microbianas, e incrementan su población total por la adición de nutrientes, pueden tener poco efecto en las tasas de biodegradación de HAP.
- Durante la exposición previa de los microorganismos a los HAP u otros cosustratos aromáticos (como por ejemplo tolueno) los mecanismos de interacción genética interrelacionados puede incrementar la población de degradadores de HAP y las tasas de biodegradación para otros HAP (aclimatación cruzada).
- La inoculación de poblaciones degradadoras de HAP está seriamente limitada por la presencia de otras especies nativas que compiten exitosamente por los sustratos biodisponibles.

2.-Biodisponibilidad

- Los principales procesos metabólicos de los microorganismos degradadores de HAP son vía HAP polares solubles, la disponibilidad de los hidrocarburos aromáticos está limitada por la baja solubilidad y una fuerte adsorción y secuestro en microporos o materia orgánica en el suelo. La adición de surfactantes o la homogenización *i.e.* la dispersión de los HAP en la fase acuosa, puede mejorar el transporte de HAP a los microorganismos degradadores.

3.-Nutrientes

- La biodegradación es aumentada por la adición de nitratos y fosfatos en el lugar sólo cuando los nutrientes del suelo son insuficientes, así que la adición de nutrientes incrementan la biodegradación aunque no tanto como otras técnicas como la bioaumentación.

4.- Temperatura

- La temperatura afecta la actividad enzimática y de esta manera la tasa en las vías metabólicas.

5.- Presión

- La alta presión en ambientes marinos profundos reduce la actividad biológica. Los compuestos de hidrocarburos en los ambientes marinos profundos son degradados muy lentamente y por lo consiguiente a veces persisten por décadas.

6.-pH

- El pH afecta la actividad enzimática de los microorganismos. La mayoría de las bacterias heterotróficas se desarrollan mejor cerca de la neutralidad.

7.- Salinidad

- La salinidad afecta la presión osmótica en las bacterias (Tang *et al*, 2005).

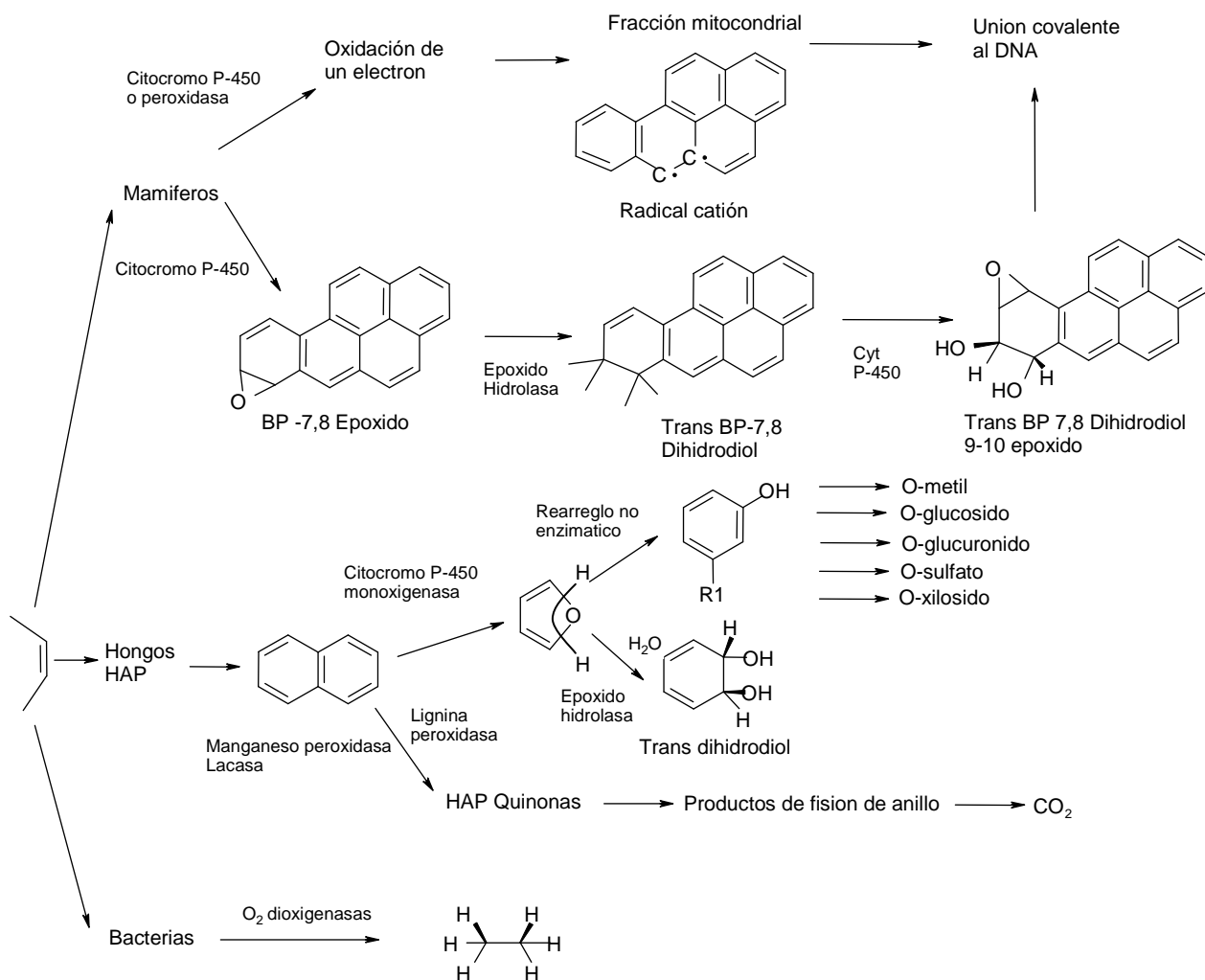


Figura 2.1.1. Rutas de biodegradación de HAP por diferentes organismos (Cerniglia, 1997).

8.- Estructura molecular del contaminante

- Las estructuras moleculares de los contaminantes deciden su persistencia en el ambiente. Los HAP de dos o tres anillos pueden ser degradados tanto aeróbica como

anaeróbicamente, los HAP de cuatro o cinco anillos en general son más difíciles de degradar bajo condiciones anaeróbicas y se degradan con mayor facilidad en condiciones aeróbicas (Tang *et al*, 2005).

Las rutas metabólicas que siguen los microorganismos para la biodegradación de los compuestos orgánicos varían según el microorganismo, según se trate de hongos, bacterias e incluso mamíferos, a continuación se muestran las vías propuestas para cada uno de estos grupos en la figura 2.1.1. (Cerniglia 1997). La ruta varía también según el modelo de hidrocarburo, no es igual para alifáticos que para HAP, las rutas mostradas son para aromáticos, generalmente los alifáticos se degradan por la vía de los ácidos grasos (beta-oxidación).

2.2. Biodegradación de hidrocarburos por hongos filamentosos

En esta tesis los hidrocarburos se estudian en base a su estructura química, se dividen en tres tipos, hidrocarburos alifáticos (como el n-hexadecano), HAP (se estudia al fenantreno como molécula modelo) y polares (como el caso del beta-naftol).

De estos tres grupos los HAP son los más emblemáticos, ya que están asociados a efectos cancerígenos y teratogénicos, una de las primeras teorías sobre el cáncer y los HAP es la de la formación de un abducto, que es la incorporación del hidrocarburo poliaromático al DNA, actualmente ya existen teorías más complejas al respecto. Un ejemplo de cáncer que se desarrolla con los HAP es el cáncer de seno, existe una correlación entre el benzo pireno y los genes de cáncer de mama BRCA-1 y BRCA-2. En este caso se propone una interacción entre un factor exógeno como los HAP y algunos factores endógenos como BRCA, esto produce una desregularización del ciclo de la célula, pérdida de DNA por reparación y finalmente una transformación neoplásica (Jeffy *et al*, 2002). Otros estudios respaldan la idea de que el citocromo P-450 transforma algunos compuestos orgánicos en mutagénicos, algunos HAP carcinógenos son metabolizados a compuestos intermediarios por el citocromo P-450 y unidos covalentemente al DNA.

Un aspecto importante en el estudio de los contaminantes es la distribución de los mismos en el medio ambiente y las variaciones en las concentraciones de los mismos que se dan en la naturaleza. Estos datos nos permiten tener una idea de la magnitud del problema y los problemas que se van a presentar durante la biorremediación.

En Inglaterra el 90 % de los HAP están en el suelo, cuando los HAP vienen de fuentes naturales se encuentran en el rango de 1-10 µg/kg. Debido a efectos antropogénicos la concentración de los HAP llega a encontrarse incrementada hasta 10 veces, pero de acuerdo a la norma oficial mexicana de emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002 se encuentran en concentraciones hasta 100 o 1000 veces mayores, dependiendo del uso del suelo, lo cual es un valor muy alto comparado con el que se da en la naturaleza, y también permite ver el grave desequilibrio causado por el hombre. La distribución de HAP también varía según el tipo de suelo, en suelos minerales de bosques es menor que en suelos urbanos y en estos menores que en sitios contaminados. La mayoría de los HAP vienen de la atmósfera, por lo consiguiente esto influye la concentración en el suelo. En zonas templadas las concentraciones de los HAP correlacionan incluso con concentraciones de metales pesados, lo cual hace más complejo el problema de la contaminación y su respectiva biorremediación (Wilcke, 2000).

A continuación se revisan los sistemas enzimáticos involucrados en la biodegradación de hidrocarburos, principalmente en los casos de *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium*, que son los hongos que se estudiaron en la tesis (y son dos de los más estudiados).

Los hidrocarburos alifáticos se oxidan hasta ácidos grasos, posteriormente se biodegradan a través de la beta-oxidación (Grady, 1985, Voet y Voet, 1995). Esta es la ruta metabólica del n-hexadecano y de otros hidrocarburos alifáticos (figura 2.2.1.). La biodegradación de hexadecano es mayor en fermentación sólida que en líquida, esto puede deberse a dos factores, el primero es la baja solubilidad del hexadecano en agua, y el segundo la solubilidad del oxígeno en agua. Se han manejado concentraciones mayores en sólido que en líquido como consecuencia de lo anterior, y los coeficientes respiratorios son mayores en

sólido que en líquido (Volke *et al*, 2003). Se biodegrada hexadecano en *A. niger* a altas concentraciones (180-717 mg/g) de, y se obtuvieron mineralizaciones del 100 % (Volke *et al*, 2005).

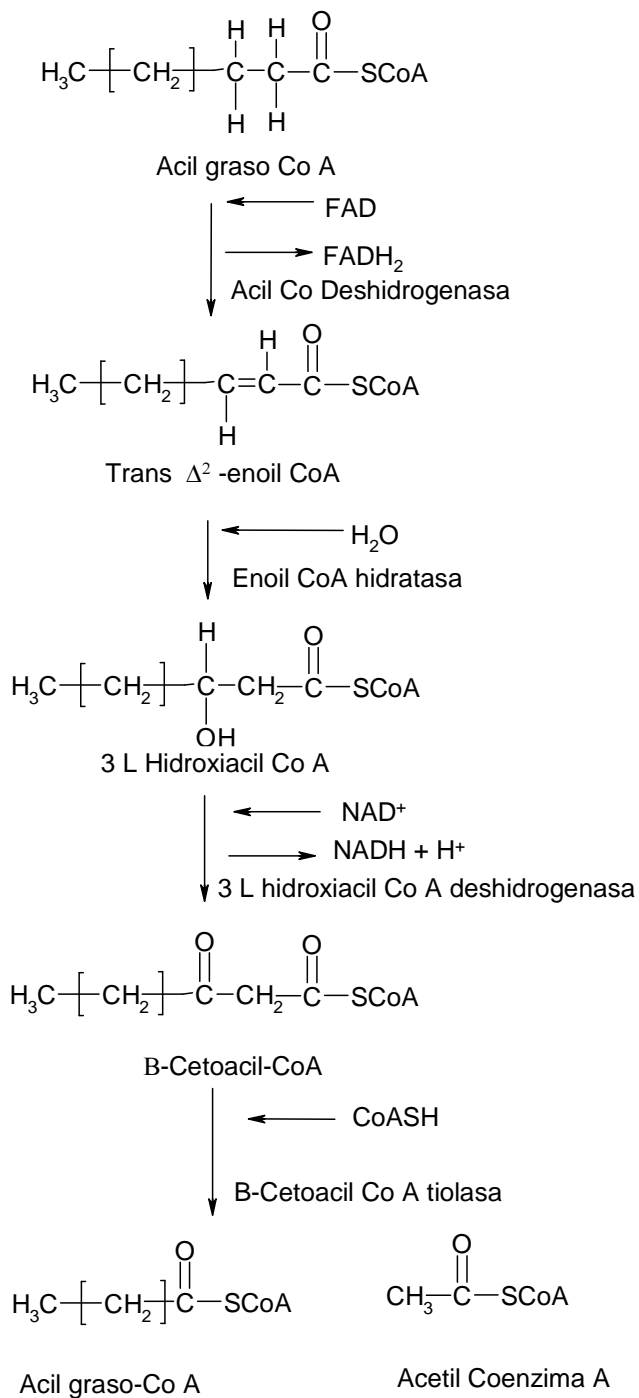
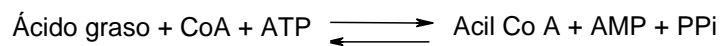


Figura 2.2.1. Ruta metabólica de la beta-oxidación (Voet y Voet, 1995).

En general los sistemas de fermentación sólida han presentado varias ventajas en cuanto a la concentración de sustrato que pueden manejar, al compararse con los de fermentación líquida.

En una serie de estudios realizados en Omán se aislaron tres cepas de hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* y *Penicillium chrysogenum* a partir de hidrocarburos, posteriormente se hicieron estudios de biodegradación en medio de cultivo líquido con 77 mg de hexadecano en 20 ml de medio, de las tres cepas la que más hexadecano consumió fue *A. niger* (60.2 mg), la que tuvo un consumo intermedio fue *A. terreus* (47.4 mg) y la cepa que menos consumió fue *P. chrysogenum* (44.0 mg). La producción de biomasa fue mas o menos la misma excepto para *A. niger*. *P. chrysogenum* produjo 50.7 mg de biomasa, *A. terreus* 50.4 mg de biomasa y *A. niger* 25.1 mg de biomasa. En estudios con petróleo crudo *A. niger* consumió solo 14.9 mg, *P. chrysogenum* 9.6 mg y *A. terreus* 8.2 mg, comparado con el hexadecano el crecimiento es menor (Elshafie, A. *et al*, 2007).

En el caso del fenantreno se ha reportado que puede ser degradado por *P. chrysosporium* y *A. niger*, Una posible ruta de biodegradación de fenantreno por *P. chrysosporium* fue propuesta por Sutherland, figura 2.2.2. (Sutherland *et al*, 1991, Ouyang y Fitzgerald, 2008).

No sólo se ha reportado la degradación de HAP por *P. chrysosporium*, sino también por *A. niger*, que aunque no tiene enzimas extracelulares generadoras de radicales, degrada fenantreno y pireno, figuras 2.2.3. y 2.2.4. (Sack *et al*, 1997 a).

En el caso de *P. chrysosporium*, este tiene un sistema enzimático muy especial, dos de las enzimas mas estudiadas son la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, se han utilizado con éxito en la biodegradación de muchos productos químicos, ver tabla 2.2.1. (Cameron *et al*, 2000), este hongo puede trabajar en dos tipos de condiciones ligninolíticas y no ligninolíticas.

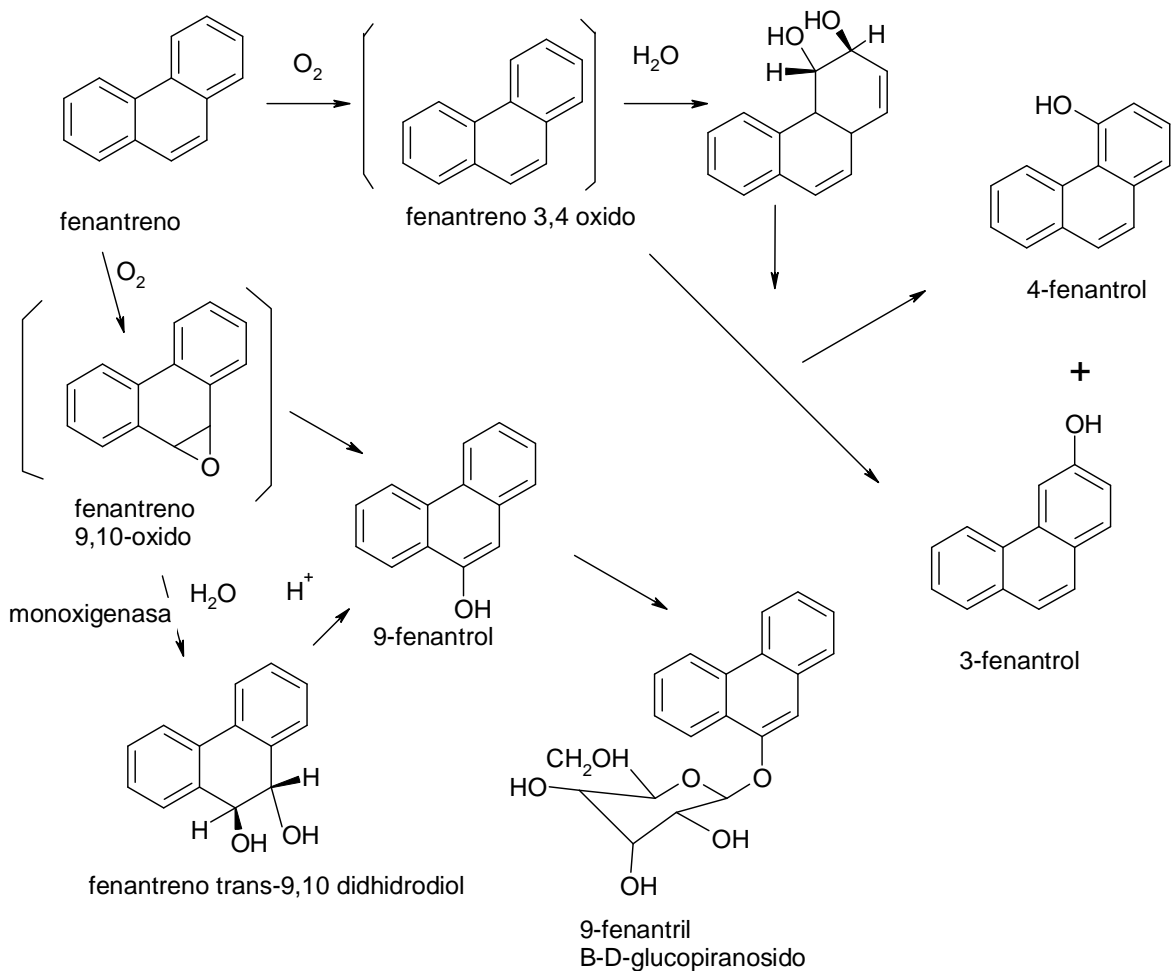


Figura 2.2.2. Ruta de biodegradación de fenantreno por *P. chrysosporium* (Sutherland *et al*, 1991, Ouyang y Fitzgerald, 2008).

Las enzimas ligninolíticas son extracelulares, y están constituidas por lignina peroxidasa así como por Manganoso peroxidasa, junto con lo anterior tiene un sistema de generación de H_2O_2 , la lignina peroxidasa se compone de 10 isoenzimas (Dosoretz *et al*, 1990 b). Las no ligninolíticas son intracelulares un ejemplo son citocromo P-450, figura 2.2.5. (Cerniglia 1997).

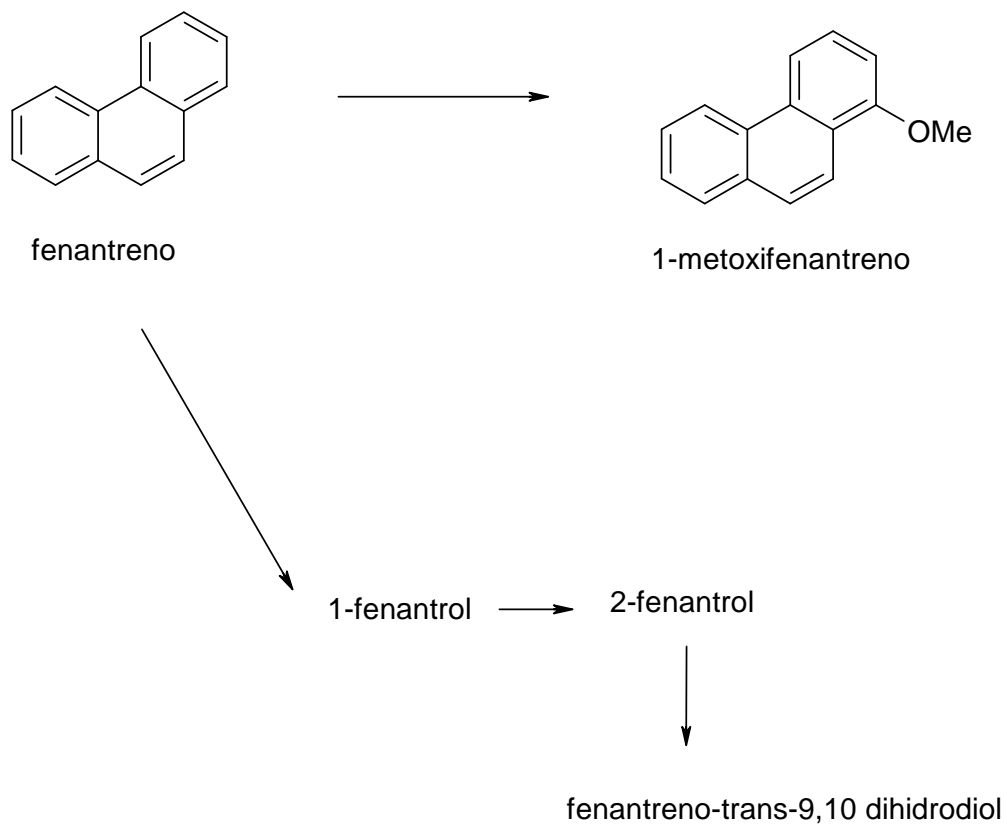


Figura 2.2.3. Ruta de degradación de fenantreno por *A. niger* (Sack *et al* 1997a).

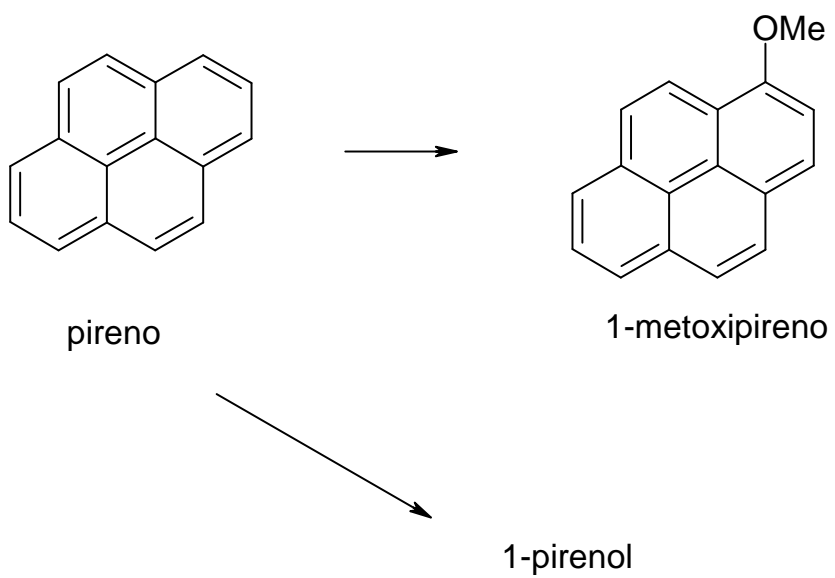


Figura 2.2.4. Ruta de degradación de pireno por *A. niger* (Sack *et al* 1997 a).

Tabla 2.2.1. Compuestos químicos degradados por *P. chrysosporium* (Cameron *et al*, 2000).

Biopolímeros	Celulosa Lignina Lignina Kraft
Polímeros sintéticos	Poliacrilato Poliacrilamida Nylon
Compuestos aromáticos clorados	2,4-Dicloroanilina 2,4-Diclorofenol Pentaclorofenol Ácido 2,4,6, diclorobenzoico 2,4,5, triclorofenol 2,4,6, triclorofenol Ácido 2,4,5- triclofenoxiacetico
Colorantes	Colorantes azo Azul de bromofenol Cristal violeta Rojo cresol
Explosivos	TNT (2,4,6-Trinitrotolueno) DNT (2,4 .Dinitrotolueno) RDX (Hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5triazina) HMX (Octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina) Nitroglicerina
Pesticidas	DDT (1,1,1-tricloro-2,2 bis-(4-clorofeniletano) Clorano (octaclorohexahidrometanoindano) Lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorohexano) Toxafeno (mezcla de canfenos clorados)

Continúa en la página siguiente

Continuación de la página anterior

Compuestos policíclicos aromáticos	Antraceno Benzo (a) pireno Criseno Naftaleno Pireno
Compuestos aromáticos clorados	Aroclor 1242 (bifenilo policlorinado) 42% Cl Aroclor 1254 (bifenilo policlorinado) 54 % Cl 2,3,7,8-tetraclorodibenzo para dioxina
Otros	Aminotriazol Azida Tetracloruro de carbono Cianuros

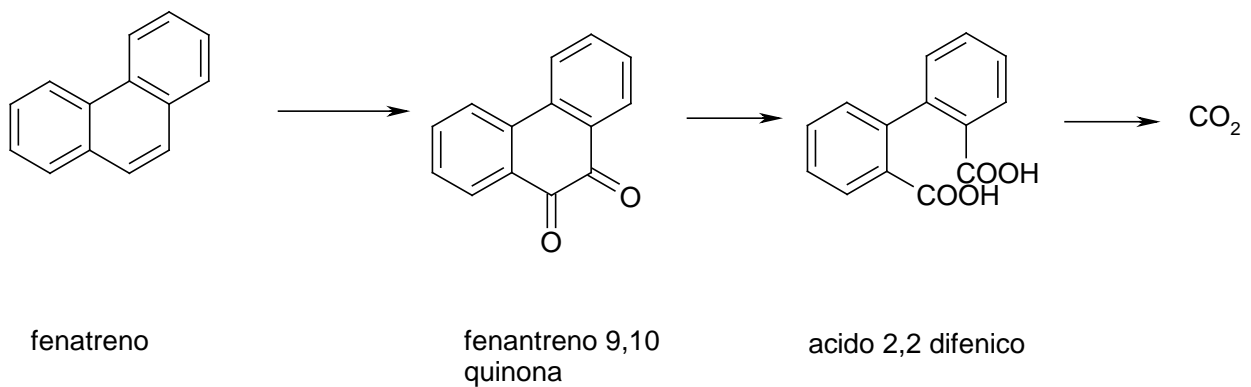


Figura 2.2.5. Ruta de biodegradación de fenantreno por hongos filamentosos (Cerniglia 1997).

El sistema de lignina peroxidasas puede biodegradar hidrocarburos aromáticos catalizando oxidaciones de un electrón en compuestos aromáticos, la lignina peroxidasa sólo degrada compuestos con potencial de ionización menor o igual a 7.55 eV. La manganeso peroxidasa oxida aromáticos con potenciales de ionización menores o iguales a 7.8 eV, esto llevaría a

pensar que la biodegradación de un HAP depende directamente de su potencial de ionización, aunque otros estudios establecen que depende más de la biodisponibilidad. Los HAP con más de 4 anillos por su hidrofobicidad no se biodegradan (Bogan y Lamar, 1995), aunque otros estudios como se verá más adelante si establecen que los hongos son capaces de degradar compuestos de más de 4 anillos, esto puede ser por que el citocromo P-450 puede degradar hidrocarburos, por lo que la degradación de HAP no depende sólo de la lignina peroxidasa o de la Manganese peroxidasa. Por lo consiguiente las posibilidades de biodegradación de un hidrocarburo dependeran de la relación entre su potencial de ionización y biodisponibilidad.

El metabolismo de los HAP en los hongos se parece mucho al metabolismo de HAP en los mamíferos, en ambos casos es regio y estereoselectivo (Cerniglia 1997), regioselectivo se refiere a la preferencia en una dirección en la formación o rompimiento de un enlace, estereoselectivo quiere decir que se favorece una única mezcla de estereroisomeros a partir de un solo substrato, un ejemplo de esto son la formación del dihidrodiol a partir de fenantreno con las enzimas de hongos como *Cuninnghamella elegans*, que produce el fenantreno 1,2 trans dihidrodiol que es una mezcla de 1R, 2R y 1S, 2S (Sutherland *et al*, 1993). En el caso de los hongos el metabolismo de HAP es más lento que en mamíferos (Cerniglia 1997), esto hace que los hongos sean un modelo interesante para estudiar el metabolismo de HAP que se puede comparar con el de los mamíferos.

En el caso de los cultivos de *P. chrysosporium* con el tiempo se producen enzimas proteolíticas que pueden degradar las enzimas ligninolíticas, la adición de glucosa inhibe la proteasa (una de estas enzimas ligninolíticas) y activa la ligninasa, el oxígeno tiene el efecto contrario, incrementa la proteasa y baja la ligninasa (Dosoretz *et al*, 1990 a). Lo anterior indica que la glucosa produce una represión catabólica sobre las proteasas (Dosoretz *et al*, 1990 b), esto es muy importante ya que dependiendo de la interacción de las proteasas es posible aumentar el tiempo de degradación de las enzimas ligninolíticas

Lo que diferencia el cambio entre las condiciones ligninolíticas y no ligninolíticas es la cantidad de nitrógeno, en condiciones de poco nitrógeno (ligninolíticas), se produce la

lignina peroxidasa y/o la manganeso peroxidasa, condiciones de mucho nitrógeno son no ligninolíticas. Existen estudios que reportan la biodegradación de fenantreno tanto en condiciones ligninolíticas como no ligninolíticas, por lo que existen otras enzimas involucradas en la degradación de fenantreno por *P. chrysosporium* (Dhawale *et al*, 1992), es decir que el fenantreno se puede degradar en ambas condiciones.

Las ligninasas se producen durante el metabolismo secundario, son glicoproteínas con grupos hemo, una prueba muy usada para ver su actividad es hacerlas reaccionar con alcohol veratrílico el cual no absorbe a 310 nm, las ligninasas en presencia de H₂O₂ lo convierten a veratraldehído, que sí absorbe a 310 nm (Tien y Kirk, 1988).

A nivel genético, la transcripción de genes que codifican para la síntesis de la lignina peroxidasa se controla por la presencia de AMP cíclico, existe una relación entre lignina peroxidasa y las especies reactivas de oxígeno, cuando el nitrógeno disminuye, el AMP cíclico aumenta y este induce la producción de lignina peroxidasa, es decir se dan las condiciones ligninolíticas. Las células de *P. chrysosporium* producen una alta concentración de las especies reactivas de oxígeno, las especies reactivas de oxígeno inducen la formación de lignina peroxidasa (Belinky *et al*, 2003). También se han hecho estudios de Manganeso peroxidadas recombinantes en *P. chrysosporium* y de producción de Manganeso peroxidadas en *A. niger* (Larrondo *et al*, 2001 y Conesa *et al* 2002).

Las manganeso peroxidadas oxidan fenoles a través de una conversión de Mn²⁺ a Mn³⁺, aparentemente se encuentran reguladas por diferentes genes ya que la secuencia de aminoácidos terminal es diferente para cada una, se componen de 3 isoenzimas (Pease y Tien, 1992).

Las Manganeso peroxidadas presentan dependencia de la concentración de Mn en la biodegradación, sin embargo, la adición de Mn no es esencial para la biodegradación de hidrocarburos aromáticos (Zheng y Obbard, 2002).

Existe un punto de polémica en cuanto a la producción de lacasas por *P. chrysosporium*, según un estudio hecho por Cameron *et al*, 2000 existe la producción de lacasas en *P. chrysosporium*, éstas utilizan cobre y O₂ para degradar fenoles. Y la celobiosa deshidrogenasa que son capaces de degradar explosivos (Cameron *et al*, 2000), sin embargo, se cree que la oxidación de ABTS (un acarreador de electrones exógeno) puede ser un error producido por el Mn³⁺, en estudios a nivel genoma no se ha encontrado la parte que codifica para esta enzima, se piensa que esta enzima no es una lacasa capaz de degradar fenantreno si no una oxidasa multicobre, esto de acuerdo a cuatro secuencias con homología en la región de 25 Kb (Kersten y Cullen, 2007). La teoría de que no se producen lacasas en *P. chrysosporium* es respaldada por Larrondo *et al* (2003), quienes también encontraron que no se encuentran codificadas en el genoma, aunque su hipótesis es que se trata de una ferroxidasa, no una oxidasa multicobre.

Los sistemas enzimáticos de lacasas se encuentran en otros tipos de hongos, en la oxidación de hidrocarburos aromáticos involucran radicales fenoxi que dependen de sus potenciales de oxidación, incluso la biodegradación de antraceno y antroquinona se da con fenol y anilina. La oxidación de HAP por fermentación líquida se da sin contacto directo de la enzima con el substrato e involucra la interacción de mediadores de bajo peso molecular en su estado oxidado. Aminoácidos fenólicos con grupos -SH como la tirosina actúan como mediadores (Johannes y Majcherczyk, 2000).

Otro mecanismo de degradación de hidrocarburos en *P. chrysosporium* se produce por el efecto de monoxigenasas de citocromo P-450. Incluso los xenobióticos pueden inducir el citocromo P-450 tanto en condiciones ligninolíticas como no ligninolíticas (Doddapaneni y Yadav, 2005).

En estudios de biodegradación de fenantreno en medio líquido se encontró que solo el 5 % de fenantreno permanece en un medio de cultivo después de 27 días de cultivo. De acuerdo a este estudio no se ha reportado ningún hidrocarburo poliaromático que resista el ataque de *P. chrysosporium*. Aparentemente la ligninasa degrada HAP con potenciales de oxidación menores o iguales a 7.56 ev (benzo[a]pireno, benzo[ghi]perileno, benzo[k]fluoranteno y

antraceno). Pero *P. chrysosporium* puede oxidar HAP con potenciales de ionización mayores a 8.0 ev como el trifenileno y fenantreno (Bumpus, 1989).

En algunos estudios se ha reportado que es necesaria la presencia de biomasa junto con la enzima para oxidar los HAP (tal vez por algún componente de biomasa asociado a la producción de H₂O₂), por lo consiguiente la publicación en algunos artículos de la purificación de enzimas a partir de algunos microorganismos que son capaces de degradar hidrocarburos sin la presencia de biomasa parece extraña (Zheng y Obbard, 2002).

P. chrysosporium también degrada halogenados, posiblemente mediante el mismo sistema enzimático que degrada lignina (Bumpus *et al*, 1985). También se ha reportado degradación de alquilbencensulfonato lineal en cultivo en caja Petri y en medio líquido a una concentración de 2 mg/l en el cual se logra una degradación del 100 % en 6 días. A altas concentraciones el alquilbencensulfonato no se degrada, la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa son esenciales para transformar el alquilbencensulfonato lineal por *P. chrysosporium*, la cadena lateral se oxida y se corta formando sulfonil carboxilatos, este fenómeno es mayor en cultivos de poco nitrógeno que en cultivos con mas nitrógeno (Yadav *et al*, 2001).

P. chrysosporium biodegrada diesel en medio SBM líquido (medio basal de stanier), a concentraciones de 1000 mg/l, durante los primeros 4 días se ve una inhibición, pero después de 14 días se biodegrada, esta inhibición podría ser más parecida a una fase de adaptación, sin embargo la inhibición es comparable a cuando no hay otra fuente de carbono más que el hidrocarburo. Por otra parte, la biodegradación de alcanos a pH neutro ocurre en medios de cultivo con alto nitrógeno en los cuales la producción de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa está suprimida y por lo consiguiente no están implicadas. Si se adiciona un inhibidor de citocromo P-450 se observa una inhibición de crecimiento y de formación de metabolitos, por lo que en este estudio concluyen que la enzima citocromo P-450 esta involucrada en la biodegradación de alcanos y de diesel (Kanaly y Hur Hor, 2006), se ha demostrado que la biodegradación de hidrocarburos se da por diferentes sistemas enzimáticos como habíamos dicho anteriormente.

Conesa *et al*, (2000) ha estudiado la producción de peroxidasa en *A. niger*, en estos estudios Conesa ha trabajado con genes que expresan para lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, los ha clonado en cepas de *A. niger* deficientes en la producción de proteínas, y logrado la fusión de estos genes pero la expresión de estas enzimas no han mostrado la actividad esperada, esto puede deberse a que la expresión de estas enzimas está supeditada a genes reguladores y proteínas acarreadoras, lo cual hace que este sistema enzimático sea más complejo.

Otro hongo filamentoso que degrada fenantreno es *Cunninghamella elegans*, se ha encontrado que la cantidad de O₂ favorece la bioconversión de fenantreno (Lisowska *et al*, 2006). También se han hecho estudios de la relación entre fenantreno y corticosterona en *Cunninghamella elegans*, se adicionó cortexolona a una fermentación con fenantreno y se observó que el fenantreno afecta la hidroxilación de cortexolona, también se observó que al adicionar cortexolona se aumenta la producción de citocromo P-450, lo cual sugiere una relación entre hidroxilasas de esteroides y enzimas degradadoras de fenantreno, siendo la adición de cortexolona una forma de incrementar la biodegradación de fenantreno (Lisowska *et al*, 2003). Otro hongo como *C. blackesleeana* es capaz de degradar colesterol, camfor y nafatleno (Bhosale *et al*, 2006). Varios hidrocarburos aromáticos se degradan por hongos filamentosos, como se muestra en la tabla 2.2.2. (Cerniglia 1997).

La degradación de fenantreno no solo se ha realizado con *P. chrysosporium*, si no también con *Cunninghamella elegans*, *Pleurotus ostreatus* y otros hongos, *Pleurotus ostreatus* mineraliza hasta un 3.0 % de fenantreno en 15 días, también mineralizó 0.4 % de pireno y 0.19 % de antraceno (Bezalel *et al*, 1996 a).

Tabla 2.2.2. Compuestos orgánicos y hongos filamentosos que los degradan, (Cerniglia, 1997)

Compuesto	Organismo
Acenafteno	<i>Cunninghamella elegans</i>
Antraceno	<i>Bjerkandera sp</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus sacor-caju</i> , <i>Ramaria sp</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Trametes versicolor</i> .
Fenantreno	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Fluoranteno	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Laetiporus sulphurus</i> , <i>Penicillium sp</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i>
Fluoreno	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Laetiporus sulphurus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes versicolor</i>
Pireno	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Agrocybe aegerita</i> , <i>Candida parapsilopsis</i> , <i>Crinipellis maxima</i> , <i>Crinipellis perniciososa</i> , <i>Crinipellis stiparia</i> , <i>Crinipellis sonata</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Kuehneromyces mutabilis</i> , <i>Marasmiellus reamealis</i> , <i>Marasmius rotula</i> , <i>Mucor sp</i> , <i>Naematoloma frowardii</i> , <i>Penicillium janczewski</i> , <i>Penicillium Janthinelleum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i>
Benzo (a) antreceno	<i>Candida krusei</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phanerochaete laevis</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Rhodotorulla minuta</i> , <i>Sybcephalastrum racemosum</i> , <i>Trametes versicolor</i>

Continúa en la página siguiente

Continuación de la página anterior

Benzo (a) pireno	<i>Aspergillus ochraceus, Bjerkhandera adusta, Bjerkhandera sp, Candida maltosa, Candida tropicalis, Chrysosporium pannorum, Cunninghamella elegans, Mortierella verrucosa, Naematoloma frowardii, Neurospora crassa, Penicillium jancsewskii, Penicillium janthinellum, Phanerochaete chrysosporium, Phanerochaete laevis, Pleurotus ostreatus, Ramaria sp, Syncephalastrum racemosum, Trametes versicolor, Trichoderma sp, Trichoderma viride</i>
Criseno	<i>Cunninghamella elegans, Penicillium janthinellum, Syncephalastrum racemosum</i>
Benzo (e) pireno	<i>Cunninghamella elegans</i>

De la degradación de fenantreno se han estudiado diferentes metabolitos de diferentes microorganismos, ver tabla 2.2.3. (Sack *et al*, 1997 b).

Tabla 2.2.3. Microorganismos y los metabolitos del fenantreno

Microorganismo	Metabolitos
<i>L. sulphurs</i>	Fenantreno trans 1,2 dihidrodiol Fenantreno trans 3,4 dihidrodiol Feanatrol Fenantreno monohidratado en C-1
<i>A. aegerita</i>	Fenantreno trans 1,2 dihidrodiol Fenantreno trans 3,4 dihidrodiol Feanatrol
<i>F. velutipes</i>	Feanatrol Fenantreno monihidratado en C-1

En *Pleurotus ostreatus*, se han estudiado las lacasas amarillas (Pozdnyakova *et al*, 2006a), estas enzimas pueden degradar algunos hidrocarburos aromáticos. Se descubrió que la persistencia de los HAP aumentaba con el tamaño, angularidad, peso molecular y coeficiente de partición en octanol, es decir a más anillos, y más hidrófobo más recalcitrante es el hidrocarburo. De esta manera se encontró que el pireno es más recalcitrante que el fluoranteno, este más que el fenantreno, este que el antraceno y este que el naftaleno. Pero finalmente todos pueden ser degradados por la lacasa amarilla (Pozdnyakova *et al*, 2006a). En otros estudios se encontró que *Pleurotus ostreatus* metaboliza 94 % de fenantreno, 60 % de antraceno y 89% de pireno en 7 días de biodegradación (Pozdnyakova *et al*, 2006b).

En *Pleurotus ostreatus* se han aislado algunos de los metabolitos producidos, el ataque se produce en la región K del fenantreno, el primer posible metabolito producido es fenantreno 9,10-oxido, seguido de fenantreno trans 9,10-dihidrodiol después 9,10-dihidroxifenantreno para terminar en 9,10-fenantroquinona y ácido 2,2-difenico. La transformación de fenantreno a trans-9R-10R dihidrodiol puede ser efectuada por citocromo P-450, esta transformación es muy parecida a la que efectúa *Cunninghamella elegans*, en el caso de *P. chrysosporium* esta es distinta porque el metabolito que se produce es trans-9S-10S dihidrodiol, un enantiomero igual que el que produce *Cunninghamella elegans* (Bezalel L. *et al* 1996 b).

El metabolismo de fenantreno por *Pleurotus ostreatus* tiene dos fases, en la fase I se produce epóxido hidrolasa posiblemente por citocromo P-450, que incorpora O₂ y forma epóxidos, después epóxido hidrolasa y transdihidrodiol, en la fase II se producen reacciones de conjugación que adicionan sulfatos o azúcares para producir sulfatos o glucósidos que hacen el fenantreno más soluble y menos tóxico, estas reacciones se llevan a cabo por enzimas como 1-cloro-2,4-dinitrobenzo glutatión s-transferasa que se encuentra en el citosol, UDP glucoronosiltransferasa y UDP glucosil transferasa que son microsomales (Bezalel *et al*, 1997).

En cambio en el caso de *Cunninghamella elegans* este se ha encontrado que produce algunos conjugados del fenantreno como sulfatos, glucurónidos y glucósidos (fenantreno β -glucopiranosido). Durante el metabolismo de fenantreno un 100 % del fenantreno desaparece a las 96 horas, una parte se transforma en 1-fenantrol glucósido, que a las 72 horas desaparece. Una posible vía de degradación de fenantreno por *Cunninghamella elegans* es la producción de fenantrol, posiblemente glicosilación del mismo y la formación de 1,2- 3,4- y 9,10- transdihidrodiol, después fenoles, seguidos de quinonas, y después dihidrodiol epóxidos. *Cunninghamella elegans* produce S,S dihidrodiol (Cerniglia *et al*, 1989)

Otro hongo que consume fenantreno es *Bjerkandera sp*, en estudios realizados con suelos contaminados con petróleo, se aisló una cepa de *Bjerkandera sp*, la cual después se estudió con diferentes medios de cultivo con extracto de levadura y a diferentes concentraciones de glucosa, Manganeseo y pH. Se midió la producción enzimática de Manganeseo peroxidasa y lignino peroxidasa. La mayor producción fue a una concentración de glucosa de 1 g/L, 80 mg/L de Manganeseo y un pH ácido de 3. En experimentos realizados después a diferentes temperaturas y pH, se encontró una tasa máxima de degradación de $0.17 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ a partir de una concentración inicial de fenantreno de 100 mg/l. La tasa de consumo de glucosa fue de $0.5 \text{ gl}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A partir de los datos obtenidos se piensa que la degradación de fenantreno se obtuvo principalmente por la Manganeseo peroxidasa, el manganeseo y el H_2O_2 son necesarios para la reacción (Terrazas-Siles *et al*, 2005).

Trametes versicolor también es capaz de biodegradar fenantreno, en experimentos realizados con 100 mg/l de fenantreno en medio líquido se preincubó durante cinco días y después se adicionó el fenantreno, se incubó durante 3 días más, se probaron los efectos de la agitación, los cultivos sin agitación removieron 65 % de fenantreno contra 46 % con agitación. Aparentemente se obtuvo mayor remoción del fenantreno sin agitación. Después se probaron varias concentraciones, temperaturas y pH, la máxima tasa de transformación del fenantreno se obtuvo a 100 mg/l y fue de 0.82 mg/h de fenantreno, se probaron diferentes enzimas y su capacidad de transformar fenantreno, se encontró que la lacasa no puede transformar sola el fenantreno, sólo con ayuda de ABTS (a una concentración 5 Mm)

o HBT (una concentración de 5 U/ml), se oxidan entre 40 y 30 % de 20 mg/l de fenantreno en 2 horas respectivamente (Han *et al*, 2004).

Otros HAP que se ha estudiado son el fluoreno y el fluoranteno, del primero se ha estudiado su biodegradación por *Cunninghamella elegans*, el fluoreno se transforma en 9-fluorenol por un ataque al anillo alifático, después en 9-fluorenona posiblemente por acción de una monoxigenasa y por último en 2-hidroxi 9-fluorenona posiblemente por una dioxigenasa. A partir de una concentración inicial de 0.333 mg/ml de fluoreno en medio Sabourad se obtuvo una transformación del 69 % en 120 horas. Los compuestos hidroxilados que se forman son menos tóxicos que el original (Pothuluri *et al* 1993).

En estudios realizados con *Cunninghamella Elegans* en concentraciones de 0.666 mg/ml de fluoranteno en medio sabourad durante 72 horas se metabolizó un 80 % del fluoranteno. Una posible ruta de transformación es la formación de trans 2,3 dihidrodiol y la posterior formación de 9-hidroxifluoranteno trans-2,3-dihidrodiol y 8 hidroxifluoranteno trans-2,3-dihidrodiol. También ocurre la formación de 3-(8-hidroxifluoranteno)- β - glucopiranosido y 3-fluoranteno- β -glucopiranosido (Pothuluri *et al*, 1990).

En posteriores estudios se compararon los metabolitos de biodegradación de fluoranteno de *Cunninghamella elegans* y metabolitos hepáticos, ambos sistemas produjeron un metabolito en común, fluoranteno trans-2,3 dihidrodiol, al hacer estudios de toxicidad de fluoranteno en *Salmonella* se encontró que el fluoranteno es tóxico y mutagénico, también los dihidrodioles producidos por microsomas hepáticos de ratones. Pero los dihidrodioles y metabolitos producidos por *Cunninghamella* no son tóxicos (Pothuluri *et al* 1992).

Incluso hidrocarburos de alto peso molecular pueden ser degradados por cocultivos de bacterias y hongos (aislados de suelos contaminados de creosota y de plantas productoras de gas). Boonchan *et al*, (2000) obtuvieron un cocultivo de bacterias y hongos, y lograron biodegradaciones de hidrocarburos aromáticos, incluso se demostró que el benzo(a) pireno y dibenzo (a) antraceno son utilizados como única fuente de carbono. Mientras que *P. chrysosporium* requiere de otra fuente de carbono, la tasa de mineralización de benzo (a)

pireno se incrementa cuando se inocula con un cultivo axenico adaptado a HAP conteniendo una comunidad bacteriana.

El problema de los cocultivos es que el suelo al ser una mezcla de microbios y orgánicos puede desestabilizar al cocultivo. En suma los cocultivos de hongos y bacterias pueden crecer en HAP de cinco anillos y mineralizar benzo (a) pireno como única fuente de C y energía (Boonchan *et al*, 2000), esto los convierte en un excelente sistema de biodegradación.

2.3. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Se han hecho estudios de bioaugmentación con *P. chrysosporium* en suelos contaminados controlando factores ambientales tales como pH, nitrógeno y fuente de carbono, se logró la biodegradación de HAP, con una mineralización del 38 % en 21 días (Brodkorb y Legge, 1992).

La degradación de fenantreno también se ha estudiado en compostas. Reid *et al* (2002) ha estudiado compostas de hongos, primero realizó una preincubación en tres formas, una es un suelo, una segunda es una composta con fenantreno y la tercera es una composta con un suelo contaminado con HAP, después de unos días adicionó fenantreno marcado con C ¹⁴, encontró que la composta incrementa la degradación del fenantreno pero que no hay diferencia entre los experimentos solo con fenantreno y con suelo contaminado con HAP (Reid *et al*, 2002).

No solo *P. chrysosporium* es capaz de degradar HAP, en general los hongos de la pudrición blanca biodegradan HAP. Se han hecho estudios de biodegradación de HAP en suelos, encontraron degradaciones del 100 % en algunos hidrocarburos como el naftaleno, también hubo una disminución en la toxicidad del suelo, la toxicidad se evaluó mediante pruebas de germinación usando dos organismos, *Lepidium sativum*, y *Folsomia candida* (D'annibale *et al*, 2005).

Lamar ha hecho estudios de biodegradación con hongos de la pudrición blanca, en microcosmos con suelos en una prueba a 56 días, *I. lacteus* degrada 57.7 % de una concentración inicial de 398.5 mg/Kg de hidrocarburos aromáticos en suelo, *P. ostreatus* degrada 67.3 % de una concentración inicial de 398.5 mg/Kg de hidrocarburos aromáticos en suelo (Lamar *et al*, 2002). Los estudios se llevaron después a planta piloto, a este nivel se encontraron degradaciones del 93.2 % partiendo de una concentración inicial de 319.7 mg/Kg de HAP. En sus estudios Lamar establece que los HAP de bajo peso molecular son atacados por bacterias y los de alto peso molecular (más de 4 anillos) por hongos.

En estudios de biodegradación en suelo se probaron varias cepas de hongos de la pudrición blanca, se esterilizaron muestras de suelo, y se les adicionó 50 mg/kg de fenantreno, se incubaron durante 30 días, al tiempo inicial se midió una concentración de fenantreno de 45 mg, a los 30 días en el blanco (sin inóculo) se encontró una concentración de 30.4 mg. Las cepas que más consumieron fenantreno fueron *Pleurotus eryngii* (2.0mg), *Irpex lacteus* (18.8 mg) y *Stereum hirsutum* (17.1 mg), *Phanerochaete chrysosporium* tenía una concentración final de 20.3 mg, se realizó un segundo experimento con suelo de pantano, a 2 g de suelo se adicionó 16 ml de medio de cultivo y 50 mg/kg de fenantreno, se incubaron por 30 días, en el tiempo inicial se midió una concentración inicial de 46.7 mg, a los 30 días la concentración fue de 25.6 mg, las cepas que más degradaron fenantreno fueron *Irpex lacteus* (13 mg), *Pleurotus eryngii* (13.2 mg) y *Bjerkandera adusta* (13.3 mg). *Phanerochaete chrysosporium* degradó 23.0 mg de fenantreno. La razón por la que se obtuvo menos biodegradación en el segundo experimento puede ser por la presencia de sales, que inhiben el consumo de fenantreno (Valentín L. *et al*, 2006).

También se han hecho estudios de biodegradación de fenantreno usando cocultivos de hongos con bacterias, en un suelo contaminado con hidrocarburos se aislaron cuatro cepas de bacterias (*P. aureoginose*, *P. rickettii*, *Pseudomonas sp* y *P. cepacea*) y cuatro cepas de hongos (*A. terreus*, *A. tenuis*, *T. viride* y *penicillium sp*). Se hicieron pruebas en agar con 200 mg/Kg de fenantreno a 18 días de incubación, los hongos lograron una remoción del 35 %, y las bacterias una remoción de 20 %. Esto muestra que los hongos remueven mejor el fenantreno que las bacterias bajo las condiciones experimentales ensayadas. En otros

experimentos de cocultivos de bacterias y hongos para remoción de fenantreno a una concentración inicial de 200 mg/Kg se encontró que los hongos tienen un efecto significativo en la remoción del fenantreno, lo cual no ocurre con las bacterias (Chávez-Gómez et al 2003).

D'annibale *et al*, (2006) ensayó diferentes cepas de hongos filamentosos en base a su capacidad para biodegradar poli R-478 (un colorante polimérico). Al probarse degradaron varios HAP y disminuyeron la toxicidad de los suelos. Muchos hongos se encuentran en formas metabólicas inactivas en sus hábitat, por eso el autor establece que se prefiere la bioaumentación que la bioestimulación (D' Annibale *et al*, 2006).

El uso de bacterias y hongos ha reportado buenos resultados como una técnica de biorremediación de lugares contaminados con hidrocarburos, incluso se han realizado estudios de biodegradación de fenantreno con plantas (Kuhn *et al*, 2004)

2.4. Factores que afectan la biodegradación

La biodisponibilidad definida como la cantidad de un substrato que puede llegar a una célula (Wackett L.P. y Hershberg C.D., 2001) es afectada por varios factores que afectan la biodegradación de hidrocarburos, uno es la solubilidad de los mismos. Se ha visto que el crecimiento de un microorganismo está limitado por la tasa de disolución de la fuente de carbono, aunque estos experimentos sólo se han hecho con bacterias (Stucki y Alexander, 1987). Esto no es comparable en el caso de hongos ya que su fisiología es muy distinta. Los hongos son eucariontes y las bacterias procariontes, y por lo consiguiente el sistema enzimático de los hongos es más complejo, así como su capacidad de biodegradación. Incluso en algunos estudios a nivel de biología molecular se ha encontrado que algunas bacterias utilizadoras de fenantreno se adaptan a las diferentes biodisponibilidades de fenantreno. (Friedrich *et al*, 2000)

En el caso del fenantreno este tiene una solubilidad en agua de 1.3 mg/l y un potencial de ionización de 8.19 ev, el pireno como punto de comparación tiene una solubilidad en agua de 0.14 mg/l y un potencial de ionización de 7.5 ev. En un estudio de biodegradación de

fenantreno y pireno por *Tricoderma versicolor*, se encontró que el pireno se degrada más que el fenantreno, esto indica que la capacidad de biodegradación depende más del potencial de ionización que de la solubilidad, para las condiciones experimentales ensayadas (Sack *et al*, 1997 b).

En un estudio llevado a cabo con bacterias se encontró que las bacterias causan una disminución en la concentración del sustrato soluble, en un experimento con bacterias en presencia de 50 mg/L a una hora de incubación el naftaleno tiene la misma concentración en el control abiótico que en el de biodegradación, la biodegradación comienza a las 3 horas más o menos, en ese momento la concentración del naftaleno fue menor en presencia de la bacterias que en el control de fase abiótica, por lo anterior podemos inferir que en algunos microorganismos la tasa de biodegradación es mayor que la tasa de disolución (Thomas *et al*, 1986).

En otros estudios con cultivos de *Pleurotus ostreatus* se adicionaron solventes orgánicos (como acetonitrilo y acetona) en concentraciones menores al 1 % para incrementar la solubilidad de antraceno y fluoreno. Finalmente se obtuvo una mayor biodegradación de antraceno en presencia de acetonitrilo (90 %) que de acetona (58%). Con el fluoreno fue al revés en acetonitrilo fue menor (42 %) que con acetona (82%). Un incremento en el tamaño (peso molecular) y angularidad de los HAP da como resultado mayor hidrofobicidad (mayor coeficiente de partición en octanol) y mayor estabilidad electroquímica. (Pozdnyakova *et al*, 2006b).

En el caso del fenantreno existen estudios donde se incrementa la biodisponibilidad usando Tween 80, la disolución de los HAP son un factor clave en su biodegradación, sin usar un tensoactivo, la mayor biodegradación se da en el siguiente sentido fenantreno>pireno>benzo (a) pireno, al agregar Tween 80 la biodegradación se da en sentido inverso benzo (a) pireno>pireno>fenantreno (Zheng y Obbard, 2002).

Volkering *et al*, (1995) estudiaron dos cepas de *Pseudomonas* y demostraron que la adición de Tergitol Npx con naftaleno no inhibe el crecimiento de las cepas. En experimentos de

biodegradación con Triton se vio un fuerte incremento en la k_m (constante de Michaelis-Menten), sin Triton la k_m es de 1.36, con 5 g/l la k_m es de 14.1. Existe una toxicidad inherente en los surfactantes, los surfactantes no iónicos son menos tóxicos que los iónicos. También se descubrió que la adición de surfactantes a cultivos lote incrementa la tasa de crecimiento lineal (Volkering *et al*, 1995).

Se han hecho estudios de laboratorio en el uso de biosurfactantes producidos por algunas bacterias como los ramnolipidos para biodegradación de hidrocarburos en suelos, en los cuales se ha encontrado que se incrementa la biodegradación y la densidad celular a pH ácidos en tratamientos combinados de tecnología de lavado y biodegradación en estudios con bacterias (Shin *et al*, 2006).

Según estudios de solubilidad de fenantreno realizados por Zhao *et al* (2005), es preferible el uso de surfactantes combinados que el de uno solo, una mezcla de iónicos y no iónicos produce buenos resultados aumentando la eficiencia de la solubilización. Se ha demostrado que la adición reduce la concentración micelar crítica y que incrementan el tamaño de las micelas dando como consecuencia una mayor dispersión en la fase acuosa y una consecuente mayor solubilidad aparente.

Tratándose de surfactantes puros la solubilidad del fenantreno es mayor en Tween 80, luego en Brij 35, después en Tx 100 y por último en SDS. Al estudiar surfactantes se encontró que el fenantreno se degrada más a concentraciones de 2.0 mM de SDS que con 5.0 mM del mismo, esto puede ser porque el SDS se usa como fuente de carbono, esto no ocurre cuando se mezcla SDS con Tween 80, podemos inferir que las mezclas no presentan efectos inhibitorios (Zhao *et al*, 2005).

En resumen la solubilidad de un compuesto en agua es un factor que afecta su biodegradación, entre menos soluble más recalcitrante, el uso de mezclas de tensoactivos en concentraciones bajas que no compitan con el hidrocarburo como fuente de carbono ayudan a aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos.

Otra forma de aumentar la biodisponibilidad del hidrocarburo es mediante la molienda de los suelos, ya que la interacción entre el microorganismo y el contaminante cuando son mezclados permiten la descomposición de xenobióticos sin la necesidad de solventes orgánicos. La molienda del suelo no altera significativamente el conteo bacteriano total ni la mineralogía. El molido afecta la desorción del fenantreno, las muestras de suelo molidas desorben el fenantreno más fácilmente por el equilibrio en el sistema (Napola *et al*, 2006).

Otro factor que afecta la biodegradación de los hidrocarburos es la absorción en fases sólidas, esta es otra de las causas de su persistencia, en el caso del fenentrano se han hecho modelamientos usando sistemas de isotermas de Freundlich (Leglize *et al*, 2006), lo mismo ocurre con el beta-naftol, factores que afectan la absorción son el carbono orgánico, la salinidad que causa un incremento así como la temperatura la cual es inversa a la absorción (Zhao y Yang, 2002)

2.5. Pruebas de biodegradación y toxicidad de hidrocarburos

Antes de realizar un trabajo de biorremediación es necesario ver la factibilidad de este, la factibilidad se evalúa en diferentes puntos, uno de ellos es el desarrollo de protocolos estándar de biotratabilidad. Una primera forma de ver si un químico es biodegradable es mediante una revisión de la literatura o de bases de datos de computadora. Esta búsqueda tiene una limitante, no siempre se explican las condiciones de evaluación de los resultados, aparte de que las cepas usadas para realizar las pruebas pueden ser diferentes, una de las primeras pruebas que se realizan son las pruebas de inhibición de crecimiento microbiano (pruebas de toxicidad), para ver que substancias presentes pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Existen varias pruebas de este tipo, la primera es medir el consumo de O₂ en un frasco de BOD, si hay algo que inhiba el crecimiento no habrá consumo de oxígeno. La segunda prueba que se puede efectuar es el conteo en caja de Petri, si existen inhibidores del crecimiento en el suelo o agua, estos van a afectar el conteo en la caja de Petri. Un tercer tipo de prueba de inhibición de crecimiento es diluir la muestra en relaciones logarítmicas (1:10, 1:100, 1:1000) y medir la inhibición del crecimiento en estas diluciones. El cuarto

tipo de prueba son los monitores de toxicidad microbiana que evalúan si las células presentes producen enzimas que pueden afectar una molécula indicadora rezarsurina o sales de tetrazolio, en estas pruebas también se adiciona el compuesto a degradar (Baker y Hersons, 1994).

En un estudio de biodegradación existen al menos cuatro etapas (figura 2.5.1.)

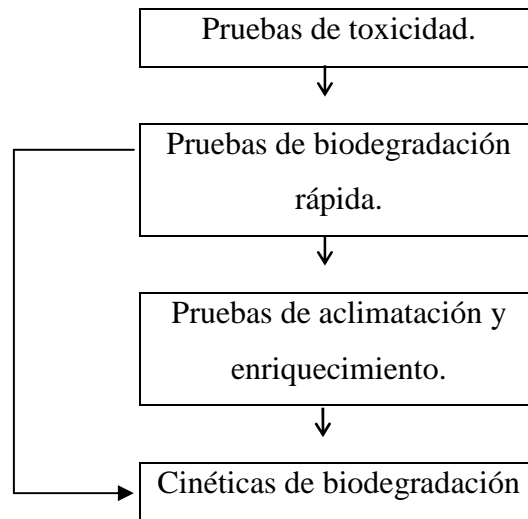


Figura 2.5.1. Etapas de un estudio de biodegradación

Las pruebas de toxicidad tienen como finalidad evaluar el grado de toxicidad en el crecimiento de los microorganismos, se adiciona a un medio de cultivo el compuesto a evaluar más otra fuente de carbono fácilmente consumible. Las pruebas de biodegradación rápida son para asegurar que la biodegradación se realiza por la fase biótica así como calcular el potencial de biodegradación. Se adiciona el compuesto a biodegradar (una sola fuente de carbono) en baja concentración. El criterio de biodegradación es una reducción del compuesto en un 20 % en un periodo de 6 semanas. Las pruebas de aclimatación y enriquecimiento usan una fuente de carbono multicomponente, se inocula directa y periódicamente, el compuesto a evaluar, este debe estar en baja concentración, la idea es adaptar los microorganismos a poder degradar los xenobióticos. El último tipo de pruebas son las cinéticas de biodegradación, estas pruebas se realizan con varios reactores aclimatados con flujo semicontinuo a diferentes tasas de crecimiento específico, la idea es

correlacionar la concentración de sustrato con las diferentes tasas de crecimiento específico (Grady, 1985).

En experimentos de toxicidad de cetonas aromáticas como acetofenona e hidroxiacetofenona sobre *P. chrysosporium* se encontró que estas incrementan su toxicidad al aumentar su hidrofobicidad (log p). De hecho se han hecho estudios de relaciones cuantitativas estructurales de toxicidad (QSTR) entre la hidrofobicidad y la toxicidad de solventes. Las cetonas son más tóxicas que el alcohol correspondiente, comparado en pruebas realizadas con *Pseudomonas putida*, esto puede deberse a un sistema de protección de las *Pseudomonas* a solventes mediante isomerización cis/trans de los ácidos grasos insaturados de la membrana celular. Una opción para disminuir la toxicidad de los hidrocarburos sobre las células es inmovilizarlas, ya que las células inmovilizadas tienen más resistencia que las libres (Hage *et al*, 2000).

Las células se protegen de los solventes orgánicos usando tres mecanismos básicos, aumentando los ácidos insaturados y disminuyendo los saturados, aumentando la proteína en la membrana y cambiando los ácidos insaturados cis a trans (Heipieper *et al*, 1994).

Otros estudios llevados a cabo con células revisan la toxicidad de solventes orgánicos sobre las mismas, se encontró que el LD₅₀ depende del Log P, cuando es menor a 1 o mayor a 5 no es tóxico, algunas moléculas que no siguen esta regla y que son tóxicas a pesar de su log P, son los fenoles, las moléculas anfipáticas y los ácidos débiles que afectan el pH intracelular.

3. Definición del problema

Durante la actividad humana se han generado muchos contaminantes xenobióticos. Uno de estos contaminantes son los hidrocarburos, algunos hidrocarburos se derivan de actividades relacionadas con la explotación petrolera. Siendo México un país productor de petróleo presenta un gran problema de contaminación sobretodo en lugares donde existían pozos de extracción o campos de refinación y durante el transporte por buques y ductos. Este problema ambiental no es sólo de México si no de un gran número de países productores y exportadores de petróleo.

Los hidrocarburos tienen diferentes efectos a nivel biótico y para la salud humana, algunos son muy difíciles de biodegradar (recalcitrantes) como es el caso de los HAP, otros son cancerígenos o teratogénicos como el benzo(a) pireno.

Cuando un hidrocarburo llega al medio ambiente es biodegradado por bacterias y hongos, cada uno sigue diferentes rutas metabólicas y diferentes estrategias para conseguir la biodegradación, cuando un hidrocarburo es muy tóxico este inhibe el crecimiento de los microorganismos y por lo consiguiente inhibe la biodegradación. Las pruebas de biodegradación se realizan con una fuente de carbono alterna (ver pruebas de biodegradación rápida en el capítulo anterior), la idea no es solo ver la biodegradación del hidrocarburo sino encontrar el intervalo de concentración en que el microorganismo puede crecer con el hidrocarburo sin experimentar algún efecto tóxico.

La toxicidad de los hidrocarburos depende de dos factores básicamente, el rango de concentraciones en que se encuentra y la estructura química del mismo, no es el mismo efecto tóxico el de un hidrocarburo lineal, un hidrocarburo poliaromático o un poliaromático polar.

La importancia de este trabajo radica en estudiar la toxicidad de cada uno de estos tres hidrocarburos modelo (hexadecano, fenantreno y beta-naftol) a tres concentraciones iniciales logarítmicamente diferentes en cinco cepas de hongos filamentosos, en agar y

medio líquido. La razón por la que se escogieron estas cinco cepas es porque *P. chrysosporium* ya se ha probado como degradadora de colorantes, las dos especies de *A. sp* se aislaron de suelos contaminados con hidrocarburos por lo que se espera que tengan una buena resistencia al efecto toxico de los hidrocarburos, *A. niger* y *P. pinophilum* se usaron como controles. La idea de probarlo en agar y medio líquido es acercarnos al comportamiento tóxico en medios acuosos y en suelos.

4. Hipótesis de trabajo

1. Los hongos filamentosos ensayados crecerán a tasas distintas, independientemente del medio en que se desarrollen pero en función de la toxicidad de los hidrocarburos modelo.

2.-La toxicidad de los hidrocarburos será función de su polaridad, a más polaridad más toxicidad.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar la toxicidad de tres hidrocarburos modelo en cinco cepas de hongos filamentosos creciendo en caja Petri con PDA y medio líquido.

5.2. Objetivos particulares

1.-Medir la toxicidad de tres hidrocarburos modelo en función de la velocidad de crecimiento radial de cada uno en las cinco cepas de hongos filamentosos.

2.-Medir la toxicidad de tres hidrocarburos modelo en función del consumo de glucosa y producción de biomasa en las cinco cepas de hongos filamentosos creciendo en medio líquido.

3.- Cuantificar la biodegradación de los hidrocarburos en medio líquido.

6. Materiales y métodos

6.1. Material

Para la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

Bioxon: Agar papa dextrosa (PDA) y extracto de levadura.

Baker: NaNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Glucosa.

Hidrocarburos (todos suministrados por Sigma S. A., México): n-hexadecano, fenantreno y beta-naftol, todos ellos grado reactivo analítico.

Disolventes diversos utilizados: Acetato de etilo, hexano, acetona, acetonitrilo, metanol y formaldehído de Baker todos ellos grado reactivo analítico.

Otros reactivos usados de Baker: ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4) y dicromato de potasio (K_2CrO_4).

6.2. Microorganismos

Se utilizaron 5 cepas de hongos filamentosos: *Aspergillus niger* (cepa ATCC 9642 donada por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, España de la colección Española de Cultivos Tipo) *Aspergillus sp B-03* (aislada durante la tesis de maestría de la M. en C. Marcela Zuleta (Zuleta, 1998)) *Aspergillus sp A-01* (aislada durante la tesis de maestría de la M. en C. Marcela Zuleta (Zuleta, M., 1998)) *Phanerochaete chrysosporium* (cepa H-298 se adquirió en el CINVESTAV (México) y *Penicillium pinophilum* (cepa ATCC 11797 donada por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia España, de la colección Española de Cultivos Tipo).

6.3. Medios de cultivo

6.3.1. Medio PDA

El medio comercial PDA se preparó a una concentración de 39 g/l, se esterilizó a 121 °C por 15 minutos, se utilizó para preparar inóculos y preservar las cinco cepas evaluadas.

6.3.2. Medio de cultivo para fermentación líquida

Se preparó el medio de cultivo líquido con la composición señalada en la tabla 6.3.2.1., se adiciono 1 ml/L de la solución de oligoelementos de la tabla 6.3.2.2., se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizó.

Tabla 6.3.2.1. Composición del medio para los estudios de cultivo líquido

Compuesto.	Concentración (g/l)
NaNO ₃	0.631
KH ₂ PO ₄	0.306
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.096
CaCl ₂	0.015
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.018
Glucosa	10
Extracto de levadura	1

Tabla 6.3.2.2. Solución de oligoelementos

Oligoelemento	Concentración (g/l)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2
H ₃ BO ₃	1.1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.16
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16

6.4. Desarrollo del inóculo

El inóculo se preparó inoculando por estría con un asa tubos de ensayo con PDA inclinado (dos por cada cepa), se incubaron a 30 °C por 3 días para las cepas de *Aspergillus* y 5 días para las demás, después se extrajeron las esporas con una solución de Tween-80 al 0.05 %, la suspensión de esporas se vació a matraces E.M. con PDA previamente gelificado, se incubaron hasta que el hongo creció y esporuló, las esporas se extrajeron con 50 ml de Tween-80 al 0.05 % en una parrilla con un agitador magnético. Por separado, se colectaron las esporas de tres matraces para *A. niger*, *A. sp* B-03 y *A. sp* A-01. Para *P. chrysosporium* y *P. pinophilum* se recolectaron las esporas de cuatro matraces ya que producen un menor número de esporas.

6.5. Conteo de esporas

La concentración de esporas se determinó contándolas al microscopio con ayuda de la cámara de Neubauer, se contaron 9 cuadrículas de las 25 de la cámara utilizando la dilución adecuada. La concentración de esporas se determinó por la ecuación:

$$N = (n * F) / D$$

Donde:

N: Número de esporas/ml de suspensión inicial

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

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

D: Dilución empleada para el conteo

6.6. Conservación de las cepas

Todas las cepas se conservaron de tres maneras:

- Resiembras periódicas (cada mes) en tubos de ensayo con PDA inclinado, cada tubo se tapó con tapones de algodón y papel parafilm a los lados, todas las cepas se mantuvieron por duplicado (dos tubos con cada cepa) a 5 °C.
- Preservación de las esporas en viales con una solución acuosa de Tween 80 al 0.05 % y glicerol al 20 %.

Se inocularon tubos de ensayo por estría con un asa en PDA inclinado (dos por cada cepa), se incubaron a 30 ° C hasta que el hongo creció y esporuló, posteriormente se recolectaron las esporas con Tween 80 al 0.05 % y se inocularon matraces con PDA previamente gelificado, nuevamente se incubaron a 30 ° C, una vez que el hongo creció y esporuló se extrajeron las esporas con una solución acuosa de Tween 80 al 0.05 % y glicerol al 20 % con ayuda de un agitador magnético en una parrilla con agitación. Una vez recolectadas las esporas se regresan al matraz en que se encontraba la solución de Tween-80 y glicerol, se llenan los viales en condiciones asépticas. Se repitió el procedimiento para cada uno de los matraces con la misma cepa, después se vació el contenido con ayuda de una pipeta estéril en cada uno de los viales, se etiquetan y se guardaron a -20 °C. Todas las cepas se mantuvieron por quintuplicado (cinco viales con cada cepa).

- Preservación en tubos de cultivo con PDA inclinado cubiertos con aceite mineral.

Cada tubo con PDA inclinado se inoculó por estría con un asa e incubados a 30 °C, una vez que el hongo creció los tubos fueron cubiertos de aceite mineral esterilizado en seco (160 °C por 45 minutos). Se taparon los tubos con los tapones de rosca y se cubrieron con papel parafilm. Se guardaron a 5 °C.

6.7. Pruebas de toxicidad en caja Petri

Se realizaron pruebas de toxicidad en cajas Petri con PDA. Fueron ensayadas tres cantidades de cada hidrocarburo modelo (0.0162 mg/cm², 0.162 mg/cm² y 1.62 mg/cm² por cada caja Petri) los cuales se colocaron en la superficie del PDA, posteriormente se inocularon por piquete con las cepas de los hongos filamentosos.

El hexadecano se adicionó formando una emulsión con 5 ml de PDA tibio en tubos de cultivo. Se adicionaron 0.001, 0.01 y 0.1 g. de hexadecano (1.3, 13 y 130 µl respectivamente) para tener las concentraciones de 0.0162 mg/cm², 0.162 mg/cm² y 1.62 mg/cm² de hexadecano, cada tubo se agitó rápidamente y se vació sin gelificar en condiciones estériles sobre una capa de PDA previamente gelificado, formando así una capa muy delgada en la superficie de la caja Petri.

A las cajas se les adicionó fenantreno y beta-naftol previamente disuelto en acetona-hexano (1:1 v/v), se preparó una solución de 100 mg/ml de fenantreno o beta-naftol en acetona-hexano, se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 con acetona-hexano, después se distribuyó por aspersión 1 ml de cada solución en cada caja sobre el agar previamente gelificado, mediante un atomizador en condiciones estériles. Se dejó evaporar el solvente durante 1 hora en la campana de flujo laminar con la finalidad de evitar su interferencia.

Posteriormente se inocularon por piquete con las cinco cepas de hongos filamentosos (*A. niger*, *Aspergillus sp B-03*, *Aspergillus sp A-01*, *P. chrysosporium* y *P. pinophilum*), se realizaron cuatro inoculaciones por piquete (se inocularon cuatro colonias en cada caja).

Se utilizó un testigo (sin hidrocarburo y sin disolvente) para todos los diseños experimentales con los 3 modelos de hidrocarburos. También se usó un control de disolvente en el caso del fenantreno y del beta-naftol (sólo se adiciona el disolvente para verificar que no existe interferencia por alguna actividad residual del disolvente). En el hexadecano se agregó el PDA extra sin el hexadecano. Los experimentos se realizaron por triplicado (Tabla 6.7.1.)

Tabla 6.7.1. Diseño experimental para los experimentos en caja Petri para cada modelo de hidrocarburo.

Tratamiento:	Solvente	Hidrocarburo modelo	Inoculo	Total de unidades experimentales
Blanco	No	No	4 inoculaciones por piquete en cada caja Petri, 3 cajas por tratamiento, cada cepa por separado	12 por cada cepa
Control de solvente	Si	No	4 inoculaciones por piquete en cada caja Petri, 3 cajas por tratamiento, cada cepa por separado	12 por cada cepa
Prueba de toxicidad	Si	3 concentraciones del hidrocarburo	4 inoculaciones por piquete en cada caja Petri, 3 cajas por tratamiento, cada cepa por separado	12 por cada cepa

Una vez inoculadas las cajas Petri se incubaron a 30 °C, el tiempo de incubación fue variable ya que la velocidad de crecimiento radial vario con el tipo de cepa y de hidrocarburo, se marcó el centro de las colonias con un plumón así como dos de los diámetros de las colonias, se midieron los diámetros a intervalos de tiempo regulares con un calibrador tipo vernier con nonio.

Con la finalidad de evitar contaminación por los atomizadores, éstos se dejaron reposar toda la noche en una solución de metanol-agua-formaldehido 70:20:10 respectivamente, para usarlos se limpiaron con gasa estéril y se enjuagaron con una solución acetona-hexano 1:1.

Antes de asperjar el fenantreno y el β -naftol en la caja Petri los atomizadores se trabajaron con soluciones iguales a las que se iban a asperjar con la finalidad de evitar pérdidas por adsorción en el plástico, se usaron atomizadores distintos para diferentes concentraciones.

6.8. Pruebas de toxicidad en medio líquido

Estudio de cultivos mixtos

El objetivo de este estudio fue verificar que al menos una de las cepas es capaz de crecer en alguna de las tres concentración 0.5, 0.05 y 0.005 mg/ml del hidrocarburo (hexadecano, fenantreno y beta-naftol) Se prepararon tubos de ensayo de 30 ml con 5 ml de medio de cultivo cada uno, se trabajaron cuatro tratamientos Blanco (contiene medio de cultivo, las 5 cepas mezcladas y no contiene hidrocarburo), biodegradación (contiene medio de cultivo, las 5 cepas mezcladas y las tres concentraciones de hidrocarburo), testigo de fase abiótica (contiene medio de cultivo, y las tres concentraciones de hidrocarburo, no contiene inóculo) y tiempos iniciales (contiene medio de cultivo, las tres concentraciones de hidrocarburo y no contiene inóculo). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

El blanco se usó como una referencia en cuanto al consumo de glucosa, las unidades de biodegradación fueron el tratamiento a evaluar (efecto tóxico y consumo de hidrocarburo),

los testigos de fase abiótica se usaron para poder cuantificar la pérdida de hidrocarburo a lo largo de la fermentación y los tiempos iniciales tenían la finalidad de poder cuantificar el hidrocarburo al principio de la fermentación.

El inóculo usado tuvo una concentración de 1×10^6 esporas/ml por cada cepa, para que así la concentración total de esporas por las cinco cepas fuera de 5×10^6 esporas/ml.

Con los tiempos iniciales se cuantificó la glucosa y la concentración del hidrocarburo inicial.

Una vez inoculados los tubos se colocaron inclinados a 45° en un shaker, se agitaron a 130 RPM y 30°C . La fermentación tuvo una duración de 5 días al término de los cuales se cuantificó glucosa, el hidrocarburo y la biomasa.

Prueba de biodegradación de cultivos axénicos

El objetivo de este estudio fue verificar cual de las cepas es capaz de crecer a una concentración de 0.05 mg/ml de hidrocarburo. Se prepararon tubos de ensayo de 30 ml con 5 ml de medio de cultivo cada uno, se trabajaron cuatro tratamientos Blanco (contiene medio de cultivo, cada cepa por separado y no contiene hidrocarburo), biodegradación (contiene medio de cultivo, cada cepa por separado y 0.05 mg/ml de hidrocarburo), testigo de fase abiótica (contiene medio de cultivo, 0.05 mg/ml de hidrocarburo, no contiene inóculo) y tiempos iniciales (contiene medio de cultivo, 0.05 mg/ml de hidrocarburo y no contiene inóculo). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

El blanco se usó como una referencia en cuanto al consumo de glucosa (concentración inicial de 10 g/L), las unidades de biodegradación fueron el tratamiento a evaluar (efecto tóxico y consumo de hexadecano), los testigos de fase abiótica se usaron para poder cuantificar la pérdida de hidrocarburo a lo largo de la fermentación y los tiempos iniciales tenían la finalidad de poder cuantificar el hexadecano al principio de la fermentación.

El inóculo usado tuvo una concentración de 5×10^6 esporas/ml por cada cepa.

Con los tiempos iniciales se cuantificó la glucosa y la concentración del hidrocarburo inicial.

Una vez inoculados los tubos se colocaron inclinados a 45° en un shaker, se agitaron a 130 RPM y 30°C . La fermentación tuvo una duración de 14 días al término de los cuales se cuantificó glucosa, el hidrocarburo y la biomasa.

6.9. Tratamiento de las muestras

6.9.1. Análisis de muestras

Se siguieron los siguientes pasos en los análisis de las muestras:

1. Inspección visual de crecimiento.
2. Análisis de glucosa en el medio de cultivo por el método enzimático (ver 6.10.)
3. Análisis de hidrocarburos en el medio de cultivo usando extracciones y posteriormente por HPLC o CG.
4. Medición de biomasa por el método gravimétrico.

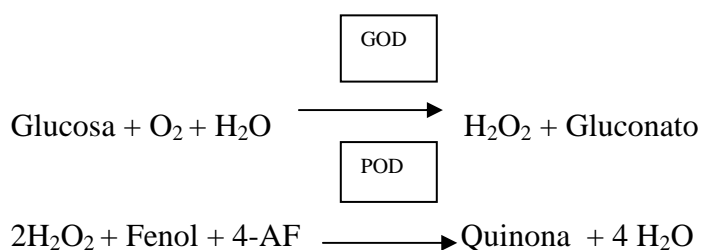
6.10. Análisis químicos

6.10.1. Glucosa

Para la medición de glucosa se usó el kit enzimático Spinreact.

Fundamento del método.

La determinación de glucosa en este kit enzimático se basa en el método de Trinder:



La glucosa reacciona con el oxígeno y agua en presencia de glucosa oxidasa (GOD), formando peróxido de hidrógeno y gluconato, después el peróxido de hidrógeno reacciona con fenol y 4 aminofenazona (4-AF) para formar quinona y agua en presencia de peroxidasa (POD). Es la formación de la quinona la que propicia el cambio de color en la solución, este cambio de color se mide a 505 nm.

Preparación del reactivo.

Se disolvieron las enzimas del frasco R-2 en el frasco R-1 (solución tampón).

Esta preparación es estable al menos 1 mes en un rango de 2 a 8 °C, se guardó lejos de la luz.

Preparación de las muestras:

Se diluyeron todas las muestras con una solución salina isotónica (0.9 % de NaCl) en una relación 1:10. Una vez diluidas se prepararon todas las muestras según la siguiente tabla:

Tabla 6.10.1.1. Medición de glucosa con el kit enzimático

Tratamiento	Blanco	Standard	Muestra
Standard	-----	20 µl	-----
Muestra	-----	-----	20 µl
Reactivo	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

- 1.-Se mezclaron e incubaron 30 minutos a temperatura ambiente.
- 2.-Se ajustó a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. Se leyó en el espectrofotómetro a 505 nm en una cubeta de 1 cm de paso de luz.
- 3.-Se calculó el contenido de glucosa con la siguiente formula:

$$\text{mg/dl} = \frac{\text{D. op. muestra}}{\text{D. op. standard}} \times \text{conc. standard.}$$

Linealidad

El método es lineal hasta 500 mg /dl (5 g/l), por consiguiente las muestras se deben diluir 1:10. La razón por la que se diluyen 1:10 y no 1:2 es porque el estándar del kit trae una concentración de 1 g/l.

6.10.2. Hexadecano

El hexadecano se analizó por cromatografía de gases usando Helio como fase móvil a un flujo de 4.6 ml/min a una presión de 18 Psi, se usó un detector FID a una temperatura de 300 °C con una atenuación de -6 y un flujo de H₂ de 45 ml/min y un flujo de aire de 450 ml/min, el horno se trabajó a una temperatura inicial de 40 °C por 6 minutos, se hizo un primer rampeo de 20 °C/min hasta 180 °C y se mantuvo por 0.5 minutos, después un segundo rampeo a 20 °C/min hasta 220 °C, se mantuvo por 1.0 minutos. El inyector fue tipo CAP a una temperatura de 250 °C con Split. En el automuestreador se hizo un lavado de preinyección con solvente, 4 lavados de preinyección con muestra y 4 lavados de postinyeccion con solvente.

6.10.2.1. Preparación de la curva patrón

Se preparó una curva patrón de 0 a 0.05 mg/ml. Se preparó una solución de 5.0 mg/ml de hexadecano en hexano, se realizaron diluciones 1:10, se adicionaron 500, 400, 300, 200, 100 y 0 µl en tubos de ensayo de 30 ml, se dejó evaporar el hexano toda la noche en la

campana de flujo laminar y al otro día se les adicionó 5 ml de medio de cultivo, el hexadecano se extrajo y analizo igual que en las muestras.

6.10.2.2. Preparación de las muestras

Para cuantificar el hexadecano en las unidades experimentales se adicionaron 2.5 ml de hexano a cada tubo de ensayo, se agitó en el vortex, se tomo una muestra de hexano que se inyectó en el CG. Se calculó el área del pico de elución de hexadecano para hacer las regresiones y calcular las concentraciones.

6.10.3. Fenantreno

El fenantreno se cuantificó por HPLC, se usó una bomba (thermoseparations) en forma isocrática con un flujo de 1.8 ml/min. y una fase móvil de acetonitrilo agua 1:1, un detector de arreglo de diodos a un longitud de onda de 253.4 nm (thermoseparations), la columna es una C18 (spherisorb).

6.10.3.1. Preparación de la curva patrón

Se preparó una solución de 5 mg/ml de fenantreno en hexano, se diluyó 1:10 y con la solución diluida se adicionaron 500, 400, 300, 200, 100 y 0 μ l en tubos de ensayo de 30 ml, se dejó evaporar el hexano toda la noche en la campana de flujo laminar y al otro día se les adicionó 5 ml de agua, el fenantreno se extrajo y analizó igual que las muestras.

6.10.3.2. Tratamiento de las muestras.

Se adicionaron 25 ml de acetato de etilo a cada tubo, se agitaron en el vortex se filtraron con filtros de teflón de 0.45 μ m, se inyectaron en el HPLC.

Se calculó el área del pico de elución de fenantreno y se realizó una regresión de área contra concentración, con los datos de la regresión se cuantificó la concentración de los problemas (las unidades experimentales).

6.10.4. Beta-naftol

El beta-naftol se cuantificó por HPLC usando una bomba en forma isocrática (Thermoseparations) a un flujo de 1.8 ml/min, una fase móvil de acetonitrilo agua 25:75, un detector de arreglo de diodos (Thermoseparations) a una longitud de onda de 224 nm, y una columna C18 spherisorb.

6.10.4.1. Preparación de la curva patrón

Se preparó una solución de 5 mg/ml de beta-naftol en acetona, se diluyó 1:10 y con la solución diluida se adicionaron 500, 400, 300, 200, 100 y 0 µl en tubos de ensayo de 30 ml, se dejó evaporar la acetona toda la noche en la campana de flujo laminar y al otro día se le adicionó 5 ml de agua, el beta-naftol se extrajo y analizó igual que las muestras.

6.10.4.2. Tratamiento de las muestras.

Se adicionaron 20 ml de agua a cada tubo, se agitaron en el vortex, Posteriormente se tomó una alícuota de cada tratamiento se filtró con filtros de teflón de 0.45 µm y se inyectó en el HPLC.

Se calculó el área del pico de elución de beta-naftol y se realizó una regresión de área contra concentración, con los datos de la regresión se cuantificó la concentración de los problemas (las unidades experimentales).

6.10.5. Cuantificación de biomasa por el método gravimétrico

Se colocó papel Whatman no. 41 a 60 °C en la estufa por 24 horas, después se enfrió el papel Whatman en el desecador por 20 minutos y se pesó. El medio de cultivo se filtró en un embudo Buchner y un matraz kitazato con ayuda de una bomba de vacío, posteriormente, se lavó la biomasa con agua destilada y el papel filtro se secó nuevamente por 24 horas en la estufa a 60 °C. Se dejó enfriar en un desecador por 20 minutos el papel

filtro junto con la biomasa. Posteriormente, se pesó el papel filtro junto con la biomasa. Por último se calculó el peso de la biomasa, según la ecuación:

Biomasa = Papel filtro con biomasa – Papel filtro (todo a peso constante).

6.10.6. Tratamiento de los resultados

6.10.6.1. Caja Petri

Se calculó el radio a partir de cada diámetro para calcular la velocidad radial de crecimiento se realizó una regresión lineal de los radios de cada unidad experimental contra tiempo, obteniendo así la pendiente que es la velocidad de crecimiento radial de cada unidad experimental, se calculó una pendiente promedio, una desviación estándar promedio y una correlación promedio para cada tratamiento. Se tabuló mediante gráficas de barras dicha pendiente para cada tratamiento y para cada cepa.

6.10.6.2. Fermentación en tubo de ensayo.

En la fermentación líquida se procedió a calcular gramos iniciales y finales de los hidrocarburos, a partir de estos se calculó el consumo de hidrocarburos por las cepas, la biomasa y el consumo de glucosa. Las pruebas se corrieron con cada uno de los 3 hidrocarburos y con cada una de las cinco cepas, se tuvieron dos etapas:

Primero se corrieron todas las cepas al mismo tiempo con cada hidrocarburo a tres concentraciones 0.5, 0.05 y 0.005 mg/ml, esta prueba se realizó con la finalidad de verificar que al menos una de las cepas era capaz de crecer en esa concentración de hidrocarburo (Tabla 6.10.6.2.1.).

Tabla 6.10.6.2.1. Diseño experimental para cada modelo de hidrocarburo

Tratamiento:	Glucosa.	Hidrocarburo modelo	Inoculo	Total de Unidades experimentales
Blanco	Si	No	Las 5 cepas mezcladas.	3
Biodegradación.	Si	3 concentraciones	Las 5 cepas mezcladas.	3 por cada concentración
Testigo de fase abiótica	Si	3 concentraciones	No	3 por cada concentración
Tiempo inicial.	Si	3 concentraciones	No	3

Después se corrieron cada una de las cepas por separado con una de las concentraciones en las que se observó crecimiento para ver cual cepa era capaz de crecer en esta concentración, así como para medir el consumo del hidrocarburo.

Tabla 6.10.6.2.2. Diseño experimental para cada modelo de hidrocarburo

Tratamiento:	Glucosa.	Hidrocarburo modelo	Inoculo	Total de Unidades experimentales
Blanco	Si	No	Si, cada cepa por separado	3 por cada cepa
Biodegradación.	Si	Una de las 3 concentraciones	Si, cada cepa por separado	3 por cada cepa
Testigo de fase abiótica	Si	Una de las 3 concentraciones	No	3
Tiempo inicial.	Si	Una de las 3 concentraciones	No	3

En todas las pruebas de biodegradación en medio líquido se midió glucosa (inicial y final), concentración de hidrocarburo (inicial y final) y biomasa (Tabla 6.10.6.2.2.).

7. Resultados y discusión

7.1. Estudios de toxicidad en caja Petri

Para realizar estos experimentos se usó una variación del método publicado por Shiaris y Cooney (1983). El objetivo de estos experimentos es ver el efecto del hidrocarburo sobre la velocidad de crecimiento radial. Se prepararon cajas Petri con PDA, se asperjó el hidrocarburo disuelto en un solvente y se calculó la velocidad de crecimiento radial promedio para cada tratamiento, incluyendo los controles, así como la respectiva desviación estándar, los resultados se muestran a continuación.

7.1.1. Efecto del hexadecano

Las velocidades de crecimiento radial promedio para hexadecano se grafican con sus desviaciones estándar en la figura 7.1.1.1. En la gráfica se aprecia que en el caso de *A. niger* y de *A. sp B-03* bajo las condiciones experimentales ensayadas no se ve efecto del hexadecano sobre la velocidad de crecimiento radial, oscilando esta entre 0.038 y 0.039, para ambas cepas con todos los tratamientos. En el caso de *A. sp A-01* tampoco se observa un efecto del hexadecano sobre la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas, aunque la velocidad de crecimiento radial es menor que con las dos cepas anteriores ensayadas oscilando entre 0.032 y 0.033. Para *P. chrysosporium* no se observa tampoco efecto del hexadecano en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas, las velocidades de crecimiento radial de esta cepa son las más altas de las cinco cepas ensayadas, varía de 0.060 a 0.069, en este experimento se midió la velocidad de crecimiento radial no la biomasa total producida, aunque *P. chrysosporium* es un hongo de lento crecimiento en cuanto a su biomasa total, puede tener una velocidad radial mayor.

En el caso de *P. pinophilum* tampoco se observa una influencia del hexadecano en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas, la velocidad de crecimiento radial es la más baja de las cinco cepas ensayadas, variando de 0.013 a 0.014.

El hexadecano no tuvo efecto tóxico en la velocidad radial de crecimiento en las cinco cepas de hongos filamentosos bajo las condiciones experimentales ensayadas.

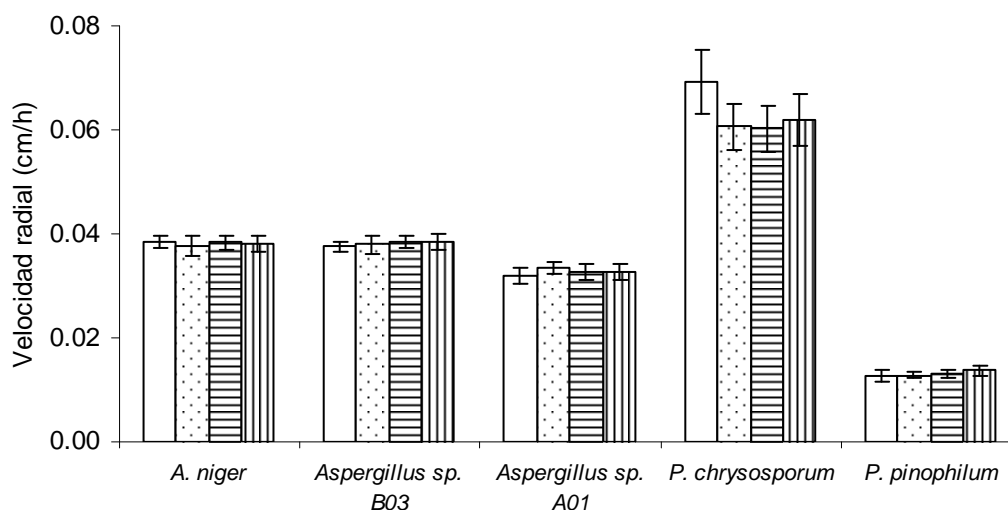


Fig. 7.1.1.1. Efecto de la concentración de hexadecano sobre la velocidad de crecimiento radial de 5 cepas de hongos filamentosos. Concentración inicial (mg/cm²): 0 , 0.0162 , 0.162 , 1.62

7.1.2. Efecto del fenantreno

Las velocidades de crecimiento radial promedio para fenantreno se grafican con sus respectivas desviaciones estándar en la figura 7.1.2.1. En la gráfica se observa que para la cepa de *A. niger* hay un efecto del fenantreno en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas, en el control la velocidad radial de crecimiento es de 0.034, en los tres tratamientos varía entre 0.006 y 0.005. Para *A. sp B-03* se observa también un efecto del fenantreno en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas, en el caso del control de solvente la velocidad radial es de 0.032, para los tres tratamientos varía entre 0.005 y 0.006. Para *A. sp A-01* también se ve un efecto del fenantreno sobre la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas, la velocidad de crecimiento radial del control fue de 0.030 y

para los tratamientos con fenantreno fue de 0.003 a 0.004. En el caso de *P. chrysosporium* también hay una disminución en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas. Para *P. pinophilum* también se aprecia una disminución en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas. Para el control la velocidad de crecimiento radial es de 0.011 y para los tratamientos con fenantreno varía entre 0.006 y 0.007.

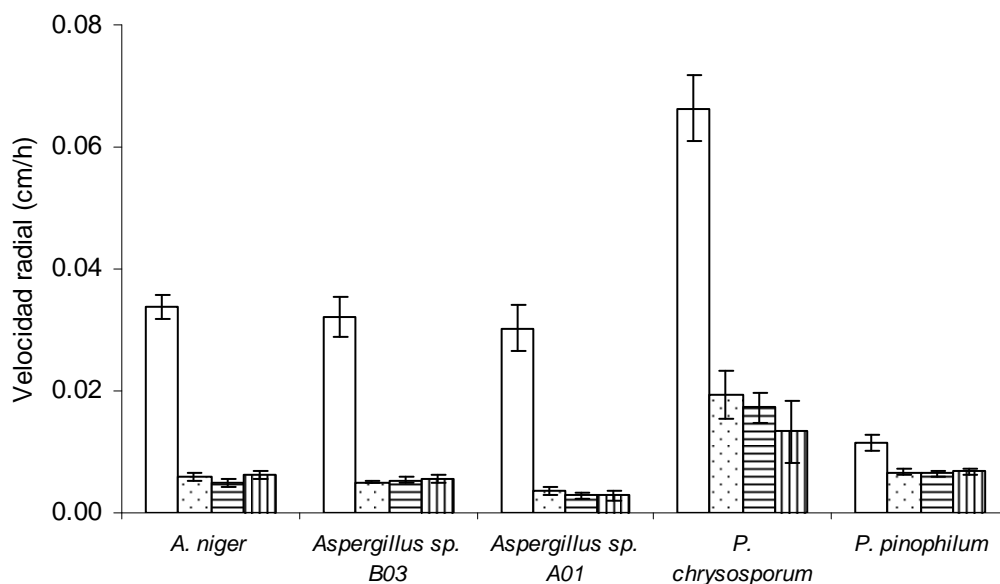


Fig. 7.1.2.1. Efecto de la concentración de fenantreno sobre la velocidad de crecimiento radial de 5 cepas de hongos filamentosos. Concentración inicial (mg/cm^2): 0 \square , 0.0162 \square , 0.162 \square , 1.62 \square

Resumiendo el fenantreno produjo una disminución en la velocidad de crecimiento radial de las cinco cepas. La cepa que menos disminución experimentó fue *P. pinophilum*.

7.1.3. Efecto del beta-naftol

Las velocidades de crecimiento radial promedio para beta-naftol se grafican con sus desviaciones estándar en la figura 7.1.3.1. En la gráfica se aprecia que en el caso de *A. niger* hay una inhibición en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas que varía de 0.041 en el control de solvente a 0.021 en la concentración más baja, en las otras dos concentraciones no hay crecimiento, la inhibición

es completa. Para *A. sp B-03* el beta-naftol también causa una disminución en la velocidad de crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas variando de 0.040 para el control a 0.023 para la concentración más baja de fenantreno, en la concentración intermedia y la más alta no hay crecimiento. Para *A. sp A-01* la velocidad radial de crecimiento disminuyó de 0.028 para el control a 0.009 para la concentración más baja de beta-naftol, en la concentración intermedia y en la más baja no hay crecimiento, por lo que el efecto tóxico del beta-naftol también se da con esta cepa bajo las condiciones experimentales ensayadas.

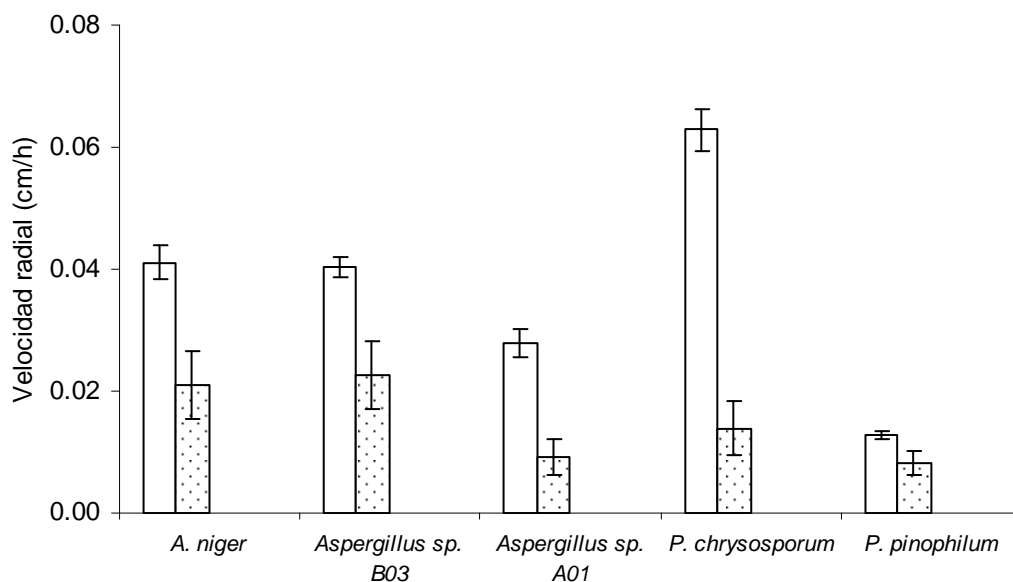


Fig. 7.1.3.1. Efecto de la concentración de beta-naftol sobre la velocidad de crecimiento radial de 5 cepas de hongos filamentosos. Concentración inicial (mg/cm^2): 0 \square , 0.0162 \square , 0.162 \square , 1.62 \square

Para *P. chrysosporium* también se observa un efecto tóxico del beta-naftol bajo las condiciones experimentales ensayadas, para el control la velocidad de crecimiento radial fue de 0.063 y para la concentración más baja fue de 0.014, para la concentración intermedia y la más alta no hubo crecimiento. Y en el caso de *P. pinophilum* se observa la misma inhibición en el crecimiento radial bajo las condiciones experimentales ensayadas, para el control la velocidad de crecimiento radial fue de 0.013 y para la concentración más baja de 0.008, nuevamente para la concentración intermedia y la más alta no hay crecimiento.

Todas las cepas experimentaron inhibición en el crecimiento en presencia de beta-naftol en la concentración más baja, en las concentraciones intermedias y más altas no hubo crecimiento.

Una de las variables que define la biodisponibilidad de un compuesto es su solubilidad en agua (Stucki y Alexander, 1987 y Sack *et al* 1997 b), la solubilidad en agua de los tres compuestos ensayados es la siguiente (tabla 7.1.3.1.):

Tabla 7.1.3.1. Solubilidad en agua de los hidrocarburos ensayados, ((1) y (3) Budavari, 1996 (2) Sack *et al*, 1997 b, (4) Lide, 1999, (5) Watts R. J. y Stanton P. C., 1999).

Compuesto	Solubilidad en agua	Coefficiente de partición de octanol en agua (log Kow)
n-hexadecano	Insoluble en agua (1)	9.07 (5)
Fenantreno	1.3 mg/l (2)	4.52 (4)
Beta-naftol	1g/l (3)	2.70 (4)

Como se puede ver el hexadecano es el menos soluble en agua, después el fenantreno y por último el beta-naftol, por lo consiguiente de los tres el más biodisponible es el beta-naftol seguido del fenantreno y por último el hexadecano. En cuanto a su polaridad, el coeficiente de partición de octanol en agua es una medida de la polaridad, el más polar es beta-naftol, seguido de fenantreno, y el menos polar es n-hexadecano.

Como la fisiología de los hongos es muy parecida a la de los mamíferos en cuanto a las rutas que siguen para biodegradar los HAP (Cerniglia, 1997), es muy probable que la toxicidad de los HAP sea casi la misma que para los mamíferos, por lo consiguiente el fenantreno y el beta-naftol son los más tóxicos, pero al ser este último el más soluble en

agua su toxicidad es letal a las concentraciones más altas. El hexadecano al ser un hidrocarburo alifático no presenta toxicidad, sólo una limitación por su solubilidad.

7.2. Estudios de toxicidad en tubo de ensayo

7.2.1. Estudios de toxicidad de hexadecano, fenantreno y beta-naftol en cultivos mixtos

El objetivo de estos estudios es encontrar una concentración en la que los hidrocarburos no sean tóxicos para poder hacer posteriormente estudios de biodegradación, el medio de cultivo tiene 10 g/L de glucosa, la idea de utilizar una fuente de carbono de fácil asimilación es estudiar el efecto tóxico del hidrocarburo ya que muchas veces el problema no es la biodegradación del hidrocarburo sino la toxicidad del mismo. Todos los estudios se hicieron por triplicado.

Se prepararon tubos de ensayo en condiciones estériles, se hicieron cinco tratamientos que fueron un testigo (tiene inóculo de todas las cepas de hongos y medio de cultivo), un testigo de fase abiótica a tres concentraciones diferentes para cada hidrocarburo (tiene el hidrocarburo el medio de cultivo pero no el inóculo), tratamiento con hexadecano a tres concentraciones diferentes (tiene el medio de cultivo, el inóculo y el hexadecano), tratamiento con fenantreno a tres concentraciones diferentes (tiene el medio de cultivo, el inóculo y el fenantreno) y tratamiento con beta-naftol a tres concentraciones diferentes (tiene el medio de cultivo, el inóculo y el beta-naftol), las tres concentraciones ensayadas de los hidrocarburos fueron 0.005, 0.05 y 0.5 g/L, el inóculo fue una mezcla de las cinco cepas estudiadas. Se midió consumo de glucosa por un método enzimático así como biomasa por el método gravimétrico. La hipótesis es que el consumo de glucosa se asocia al efecto tóxico, al haber consumo de glucosa no hay efecto tóxico del hidrocarburo.

7.2.1.1. Consumo de glucosa

En el caso de los resultados de tubo de ensayo con hexadecano primero se analizarán los resultados de consumo de glucosa para todas las cepas juntas a los 5 días de consumo, el consumo de glucosa fue de 100 %, para el blanco (que no contiene hexadecano) así como

en los que contienen 0.005, 0.05 y 0.5 g/L de hexadecano, lo cual permite inferir que no existe influencia de ninguna de las tres concentraciones de hexadecano en el consumo de glucosa bajo las condiciones probadas.

Para el fenantreno se encontró consumo de glucosa de 100 % en todos los tratamientos excepto en el de todas las cepas con 0.005 g/L el cual muestra un consumo de 99.04 %, lo cual sugiere que no hubo una influencia negativa para ninguna de las tres concentraciones de fenantreno manejadas bajo las condiciones experimentales ensayadas.

En el beta-naftol al igual que en los casos anteriores después de la fermentación se encontró un consumo de 99.89 %, para el blanco de beta-naftol, para el tratamiento con 0.005 g/L con beta-naftol el consumo fue de 100%, para el que es con 0.05 g/L el consumo fue de 98.83 % en estos tres casos el consumo de glucosa se puede considerar de 100 %, lo cual sugiere que no hubo una influencia negativa para ninguna de las concentraciones manejadas. Para el tratamiento con 0.5 g/L el consumo de glucosa fue de 4.37 % lo cual indica que no hubo crecimiento ya que no hubo consumo de glucosa, por lo que se puede pensar que el beta-naftol a esta concentración es tóxico.

En resumen en la mayoría de las condiciones evaluadas el consumo de glucosa fue del 100%. Se observó un consumo de glucosa de apenas el 4% en presencia de beta-naftol a una concentración de 0.5 g/L. Por lo que se concluye que el beta-naftol a esta concentración tiene un efecto tóxico para todas las cepas, cuando éstas son cultivadas en forma de cultivo mixto. En el caso de hexadecano y fenantreno no se observó toxicidad para este cultivo mixto bajo las condiciones evaluadas.

7.2.1.2. Producción de biomasa

En la Fig. 7.2.2.1. se presentan los datos de biomasa producida en presencia de los 3 diferentes modelos de hidrocarburos evaluados a los 5 días de incubación. En el caso de hexadecano y fenantreno a concentraciones de 0.005 a 0.5 g/L, la presencia de estos compuestos no tiene un efecto negativo sobre el crecimiento del cultivo mixto. Sin embargo, en presencia de beta-naftol, existe un aparente efecto tóxico sobre el crecimiento.

Esto lo demuestra el hecho de que el crecimiento fue nulo a la máxima concentración evaluada de este hidrocarburo.

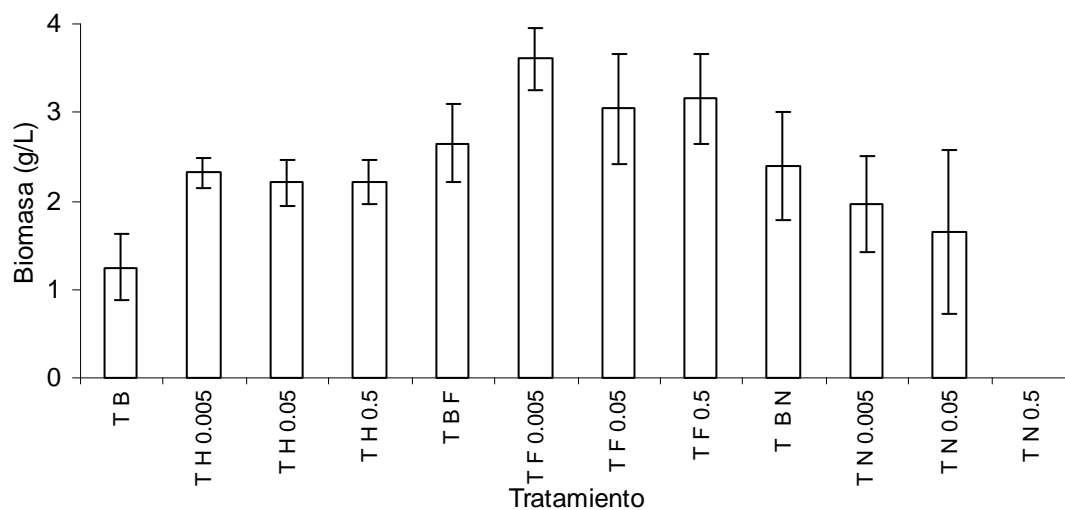


Figura 7.2.1.2.1. Producción de Biomasa en el experimento con todas las cepas en hexadecano después de 5 días de incubación (T B todas las cepas sin hexadecano, T H 0.005 Todas las cepas con 0.005 g/L de hexadecano, T H 0.05 todas las cepas con 0.05 g/L de hexadecano, T H 0.5 Todas las cepas con 0.5 g/L de hexadecano, T B F todas las cepas sin fenantreno, T F 0.005 Todas las cepas con 0.005 g/L de fenantreno, T F 0.05 todas las cepas con 0.05 g/L de fenantreno, T F 0.5 Todas las cepas con 0.5 g/L de fenantreno, TBN todas las cepas blanco de beta-naftol, T N 0.005 todas las cepas con 0.005 g/L de beta-naftol, TN 0.05 todas las cepas con 0.05 g/L de beta-naftol, TN 0.5 todas las cepas con 0.5 g/L de beta-naftol).

7.2.2. Estudios de toxicidad en hexadecano, fenantreno y beta-naftol en cultivos axenicos

La idea de los estudios, es ver cual de las cinco cepas son capaces de crecer a una concentración de 0.05 g/L con cada uno de los hidrocarburos (ya que en esta concentración al menos una de las cepas fue capaz de crecer), y por otra parte ver la biodegradación del hidrocarburo en cada cepa, el medio de cultivo tiene 10 g/L de glucosa, nuevamente la idea

de utilizar una fuente de carbono de fácil asimilación es estudiar el efecto tóxico del hidrocarburo. Todos los estudios se hicieron por triplicado.

Se prepararon tubos de ensayo en condiciones estériles, se hicieron cinco tratamientos que fueron un testigo (tiene inóculo y medio de cultivo), un testigo de fase abiótica (tiene el hidrocarburo el medio de cultivo pero no el inóculo), tratamiento con hexadecano (tiene el medio de cultivo, el inóculo y el hexadecano), tratamiento con fenantreno (tiene el medio de cultivo, el inóculo y el fenantreno) y tratamiento con beta-naftol (tiene el medio de cultivo, el inóculo y el beta-naftol), la concentración ensayada del hidrocarburo fue 0.05 g/L, el inóculo fue de cada cepa por separado, por lo cual la matriz anterior se hizo cinco veces, una para cada cepa. Se midió consumo de glucosa por un método enzimático, el hexadecano por cromatografía de gases, fenantreno y beta-naftol por HPLC, así como biomasa por el método gravimétrico.

7.2.2.1. Estudios en hexadecano

7.2.2.1.1. Consumo de glucosa

Dado que los resultados de glucosa de todas las cepas no muestran toxicidad en cuanto a crecimiento de los hongos para ninguna de las concentraciones manejadas de hexadecano. Se probó la concentración intermedia (0.05 g/L) para estudiar la biodegradación de cada cepa por separado.

En los resultados de concentración de glucosa, las biodegradaciones fueron de cerca del 100 %, excepto para el blanco de *P. chrysosporium* que es de 96.43 % y de 80.64 % para *P. chrysosporium* con el tratamiento con hexadecano, es posible ver que no existe efecto negativo del hexadecano sobre las cepas bajo las condiciones ensayadas.

7.2.2.1.2. Consumo de hexadecano

Se evaluaron las cinco cepas contra la concentración de hexadecano de 0.05 g/L, se encontró que la pérdida por fase abiótica fue casi la misma que por biodegradación (figura 7.2.2.1.2.1), la biodegradación fue de un 94.669 % para *A. niger* hasta un 99.61 % para *P.*

pinophilum. Existe la posibilidad que la eficiencia en la extracción de hexadecano no sea muy alta a esta concentración y no se puede cuantificar el hexadecano con las condiciones experimentales ensayadas.

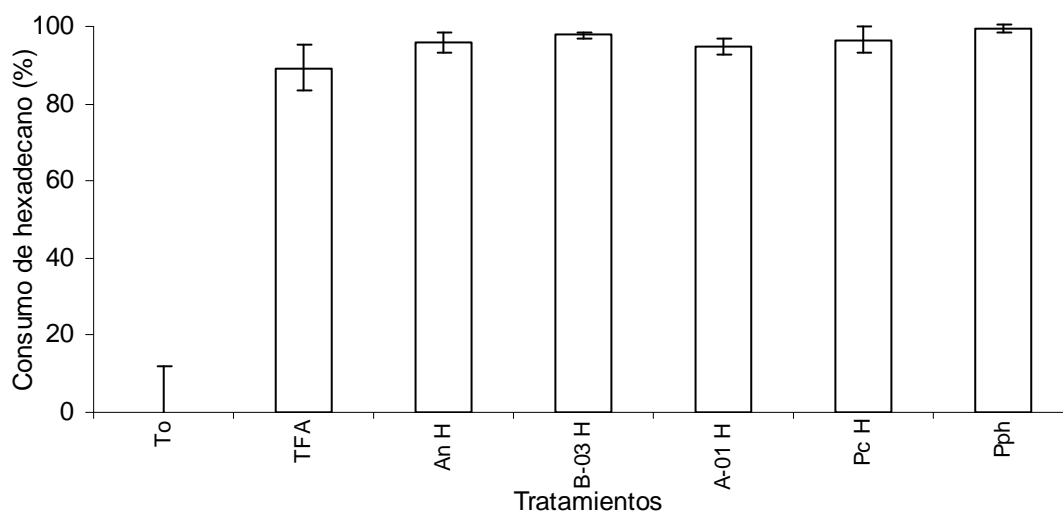


Figura 7.2.2.1.2.1. Consumo de hexadecano en cada una de las cepas por separado para una concentración de 0.05 g/L de hexadecano después de 14 días de incubación. (To tiempo inicial, TFA testigo de fase abiótica 0.05 g/L de hexadecano, An H *A. niger* con 0.05 g/L de hexadecano, B-03 H *A. sp* B-03 0.05 g/L de hexadecano, A-01 H *A. sp* 0.05 g/L de hexadecano, Pc H *P. chrysosporium* 0.05 g/L de hexadecano, PP H *P. pinophilum* 0.05 g/L de hexadecano).

7.2.2.1.3. Producción de biomasa

En las cepas por separado varía la biomasa para cada cepa, sin embargo no se encontró diferencia significativa en la biomasa entre las cepas sin hexadecano y las cepas con hexadecano (figura 7.2.2.1.3.1.).

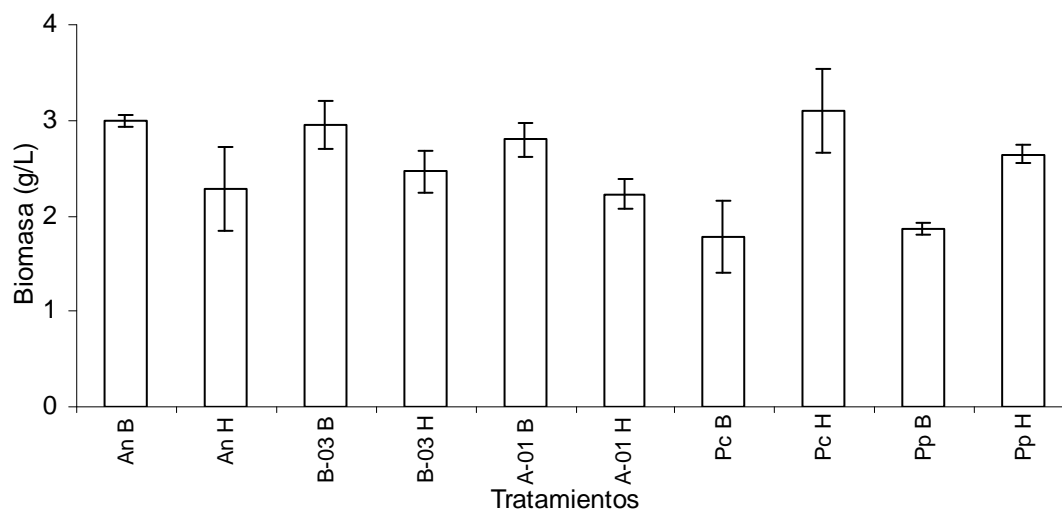


Figura 7.2.2.1.3.1. Producción de biomasa en presencia de hexadecano en cada una de las cepas por separado después de 14 días de incubación. (An B *A. niger* blanco, An H *A. niger* 0.05 g/L de hexadecano, B-03 B *A. sp* B-03 blanco, B-03 H *A. sp* B-03 0.05 g/L de hexadecano, A-01 B *A. sp* A-01 blanco, A-01 H *A. sp* A-01 0.05 g/L de hexadecano, Pc B *P. chrysosporium* blanco, Pc H *P. chrysosporium* 0.05 g/L de hexadecano, Pp B *P. pinophilum* blanco, Pp H *P. pinophilum* 0.05 g/L de hexadecano).

En el caso del hexadecano se han hecho experimentos para ver la biodegradación de hexadecano por *A. niger*, Volke ha reportado experimentos de biodegradación de hexadecano por *A. niger* en medio líquido mayores a las aquí estudiadas, (20, 40, 60 y 80 g/l) en la más baja concentración se obtuvo el máximo consumo de hexadecano pero no se obtuvo un consumo completo, sólo del 55, 50 y 37 % respectivamente a un tiempo de 31 días, aunque las condiciones experimentales fueron diferentes, los resultados pueden deberse a limitación del nutriente (Volke *et al*, 2003).

En otros estudios con *P. chrysosporium* se probaron concentraciones de n-hexadecano de 0.850 g/L en medio SBM (medio basal de Stanier) a 7 días, se obtuvieron degradaciones de

85-90 %, y se obtuvieron incrementos en la biomasa por el consumo de hexadecano (Kanaly y Hur Hor, 2006).

En este estudio las concentraciones fueron mucho más bajas 0.5, 0.05 y 0.005 g/L, y los tiempos más cortos, al revisar las concentraciones del hexadecano vemos que la del testigo de fase abiótica fue muy cercano a la de la prueba de biodegradación, esto puede deberse a la eficiencia en la extracción del hexadecano, y no hay ningún efecto tóxico del hexadecano asociado, lo cual coincide con los reportes anteriores. Las diferencias pueden deberse a los medios de cultivo y diferentes condiciones experimentales ensayadas.

Por la estructura química del hexadecano que es un hidrocarburo alifático lineal, el metabolismo del hexadecano se da por el ciclo de los ácidos grasos, y por su estructura es menos tóxico que los aromáticos.

7.2.2.2. Estudios de fenantreno

7.2.2.2.1. Consumo de glucosa

Dado que los resultados de glucosa de todas las cepas el fenantreno no muestra toxicidad para las concentraciones manejadas se probó la concentración intermedia (0.05 g/L) para ver la degradación de fenantreno de cada cepa por separado.

El consumo de glucosa fue del 100 % para todas las cepas, excepto para *P. pinophilum* que en el blanco (tratamiento sin fenantreno) fue de 99.508 % y para el tratamiento con fenantreno fue de 97.63 %, para fines prácticos las degradaciones fueron del 100 % o muy cercanas al 100% de degradación. En los resultados de consumo de glucosa, es posible ver que no existe efecto negativo del fenantreno sobre las cepas bajo las condiciones probadas.

7.2.2.2.2. Consumo de fenantreno

En el caso de fenantreno se observa una disminución de la concentración de fenantreno por fase abiótica (24.62 %). Se aprecia una biodegradación si se comparan las concentraciones

de fenantreno de los tratamientos de las diferentes cepas contra el testigo de fase abiótica, así se ve una disminución en la concentración de fenantreno para las cepas de *A. niger*, *A. sp* B-03 (65 % para las dos), *A. sp* A-01 y *P. chrysosporium* (disminución de 57 y 58 % respectivamente para las dos cepas). Para la cepa de *P. pinophilum* no hubo disminución en la concentración de fenantreno (29.21 %) ya que es muy cercana al testigo de fase abiótica (figura 7.2.2.2.2.1.).

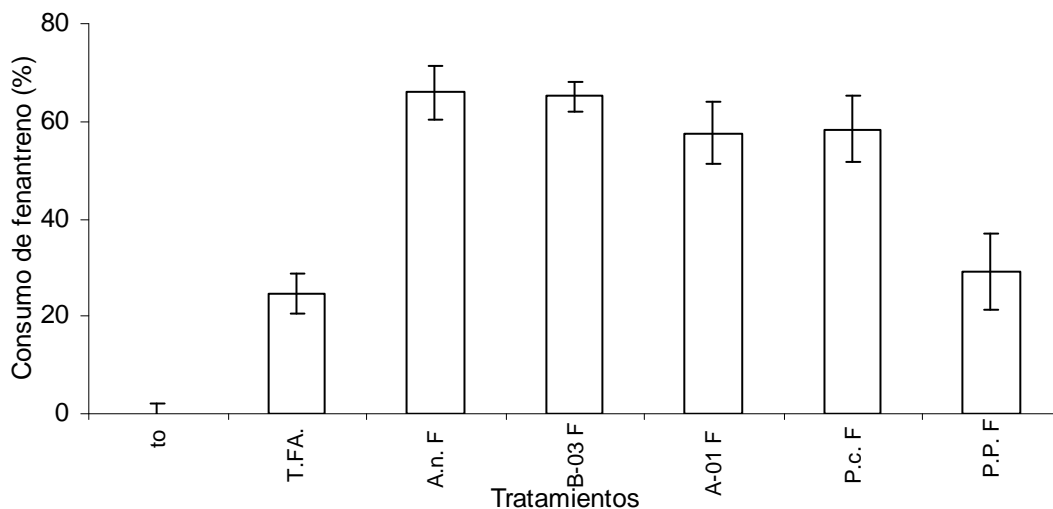


Figura 7.2.2.2.2.1. Consumo de fenantreno en cada una de las cepas por separado después de 14 días de incubación. (To tiempo inicial con 0.05 g/L de fenantreno, TFA testigo de fase abiótica 0.05 g/L de fenantreno, An F *A. niger* 0.05 g/L de fenantreno, B-03 F *A. sp* B-03 0.05 g/L de fenantreno, A-01 F *A. sp* A-01 0.05 g/L de fenantreno, Pc F *P. chrysosporium* 0.05 g/L de fenantreno, PP F *P. pinophilum* 0.05 g/L de fenantreno).

7.2.2.2.3. Producción de biomasa

No se observa ningún efecto de la concentración de fenantreno en la producción de biomasa (figura 7.2.3.3.1.).

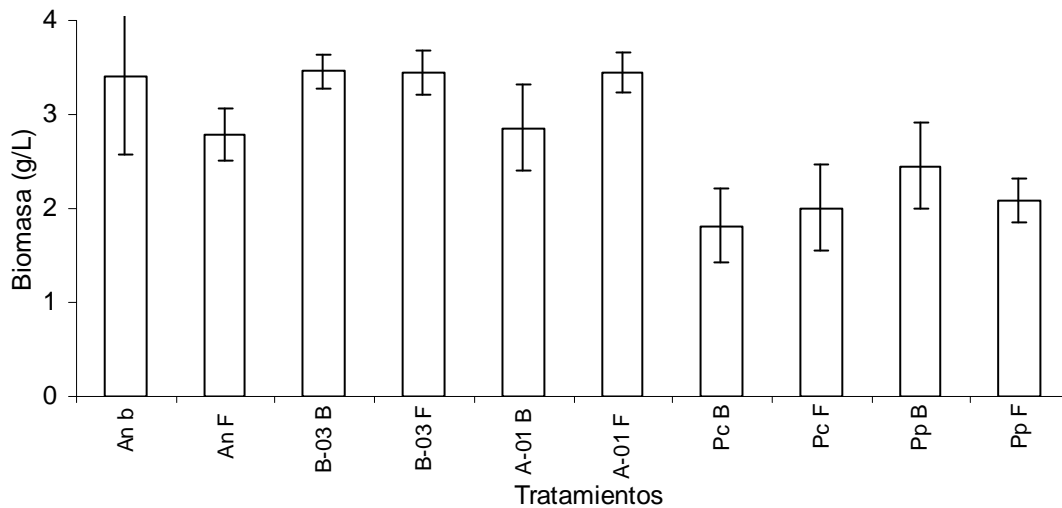


Figura 7.2.2.2.3.1. Producción de Biomasa en cada una de las cepas por separado después de 14 días de incubación. (An B *A. niger* blanco, An F *A. niger* 0.05 g/L de fenantreno, B-03 B *A. sp* B-03 blanco, B-03 F *A. sp* B-03 0.05 g/L de fenantreno, A-01 B *A. sp* A-01 blanco, A-01 F *A. sp* A-01 0.05 g/L de fenantreno, Pc B *P. chrysosporium* blanco, Pc F *P. chrysosporium* 0.05 g/L de fenantreno, Pp B *P. pinophilum* blanco, Pp F *P. pinophilum* 0.05 g/L de fenantreno).

No existe efecto tóxico del fenantreno sobre las cepas puras, según se aprecia en el consumo de glucosa, ni tampoco se afecta la producción de biomasa, tanto para las cepas juntas como por separado bajo las condiciones experimentales ensayadas.

Los estudios de biodegradación de fenantreno son más abundantes que los de n-hexadecano, en estudios llevados a cabo con *P. chrysosporium*, se probaron 0.05 g/L de fenantreno en medio líquido durante 7 días, la degradación de fenantreno fue de 100 a 88 %, ambas se probaron a un pH de 3.2. A un pH de 4.5 la degradación de fenantreno fue 99 a 88 % en condiciones ligninolíticas, y de 100 a 88 % para no ligninolíticas, en estos experimentos el fenantreno se agregaba a los 2 días de iniciado el cultivo, y se dejaba por 5 días. Estos resultados demuestran que el fenantreno se degrada en condiciones ligninolíticas como no ligninolíticas (Dhawale *et al*, 1992).

En nuestros experimentos la biodegradación fue variable en cada cepa, pero fue de un 55 % para *A. niger* que fue la que más degradó y un 6 % para *P. pinophilum* que fue la que menos degradó.

Los resultados confirman lo que se encuentra en la literatura, que tanto *A. niger* como *P. pinophilum* son capaces de degradar fenantreno, incluso Sutherland reporta algunos metabolitos de fenantreno en *P. chrysosporium* (Sutherland *et al*, 1991), y metabolitos de fenantreno en *A. niger*, (Sack *et al*, 1997a). El fenantreno incluso se degrada en mezclas con otros hidrocarburos aromáticos (Bumpus, 1989).

Una posible manera de aumentar la biodegradación del fenantreno es mediante el uso de surfactantes, que pueden aumentar la solubilidad del fenantreno en agua, aunque estos estudios se han hecho con bacterias (Volkerling *et al*, 1995).

7.2.2.3. Estudios en beta-naftol

7.2.2.3.1. Consumo de glucosa

Los resultados de glucosa demuestran que hubo un 100 % de consumo de glucosa, excepto para *P. chrysosporium*, para esta cepa no hubo consumo de glucosa en presencia de beta-naftol, por lo que podemos concluir que bajo las condiciones ensayadas el beta-naftol sólo fue tóxico para *P. chrysosporium*. Por lo anterior para esta cepa ya no se cuantificará beta-naftol ni biomasa.

7.2.2.3.2. Consumo de beta-naftol

En el caso de las concentraciones de beta-naftol evaluadas este no presenta una fuerte disminución de su concentración por fase abiótica (22 %), pero la biodegradación es alta y va de un 97.5 % y 96 % (figura 8.2.2.3.3.1.) para las cepas que presentaron una mayor biodegradación (*A. niger* y *A. sp* B-03 respectivamente), hasta un 71 % que corresponde a las cepas que menor biodegradación presentaron (*A. sp* A-01, y *P pinophilum*).

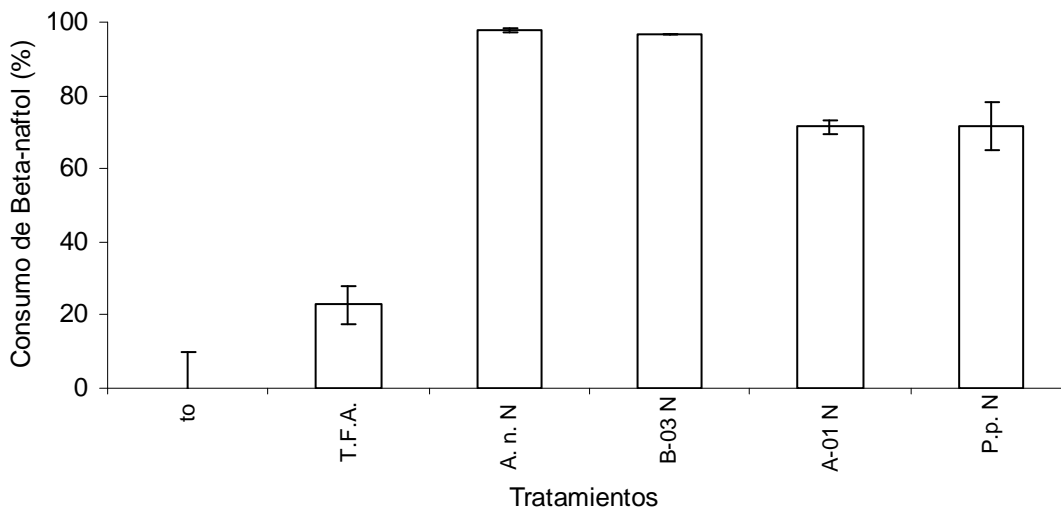


Figura 7.2.2.3.3.1. Consumo de beta-naftol en cada una de las cepas por separado después de 14 días de incubación. (To tiempo inicial 0.05 g/L de beta-naftol, TFA testigo de fase abiótica 0.05 g/L de beta-naftol, An N *A. niger* 0.05 g/L de beta-naftol, B-03 N *A. sp B-03* 0.05 g/L de beta-naftol, A-01 N *A. sp A-01* 0.05 g/L de beta-naftol, PP N *P. pinophilum* 0.05 g/L de beta-naftol).

7.2.2.3.3. Producción de biomasa

Al comparar cada blanco con la misma cepa pero con beta-naftol se puede ver una disminución en la biomasa, esta disminución fue del 52 % para el caso de *A. niger* (el hongo que menos disminución experimentó) hasta un 82 % para *P. pinophilum* (el hongo que mas disminución experimentó, figura 7.2.2.3.3.1.). Por lo anterior inferimos que el beta-naftol tiene una influencia negativa en la producción de biomasa.

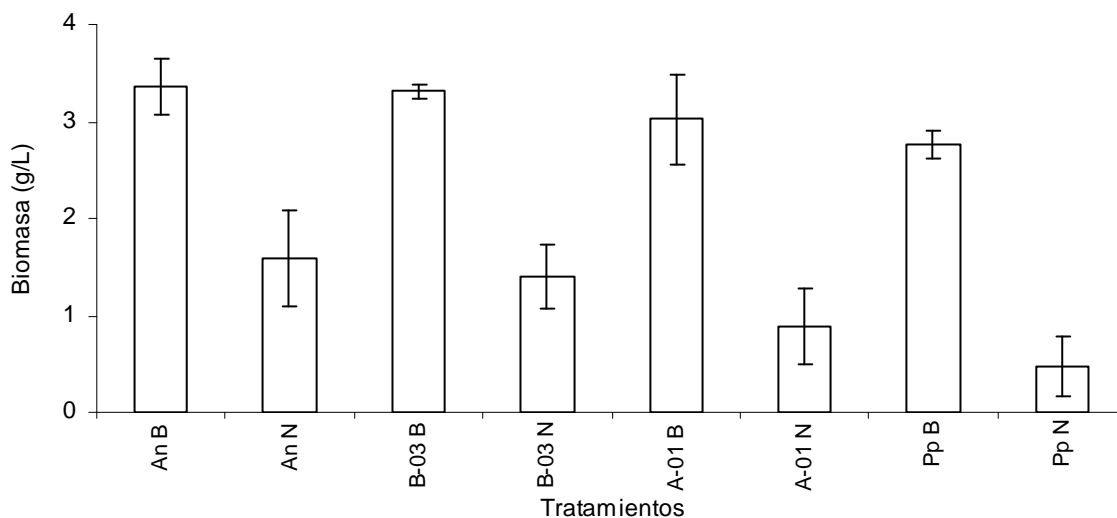


Figura 7.2.2.3.4.1. Producción de biomasa de todas las cepas por separado después de 14 días de incubación (An B *A. niger* blanco, An N *A. niger* 0.05 g/L de naftol, B-03 B *A. sp* B-03 blanco, B-03 N *A. sp* B-03 0.05 g/L de naftol, A-01 B *A. sp* A-01 blanco, A-01 N *A. sp* A-01 0.05 g/L de naftol, PP B *P. pinophilum* blanco, PP N *P. pinophilum* 0.05 g/L de naftol).

Igual que en los resultados de caja Petri, la solubilidad en agua es muy importante, por las razones discutidas anteriormente, nuevamente el hexadecano es el menos soluble en agua, después el fenantreno y por último el beta-naftol, por lo consiguiente de los tres el más biodisponible es el beta-naftol seguido del fenantreno y por último el hexadecano.

Excepto que esta vez como el cultivo es en medio líquido la solubilidad se vuelve más crítica, nuevamente como la fisiología de los hongos es muy parecida a la de los mamíferos en cuanto a las rutas que siguen para biodegradar los HAP (Cerniglia, 1997).

8. Conclusiones

La velocidad de crecimiento radial en caja Petri varía en función de la polaridad de cada hidrocarburo, siendo el más tóxico beta-naftol, seguido por fenantreno, el hexadecano no presenta efecto tóxico bajo las condiciones experimentales probadas.

En el caso del fenantreno este presentó una toxicidad intermedia entre el hexadecano y el naftol, la cepa que menos efecto tóxico presentó fue *P. Pinophilum* y la que mas efecto tóxico presentó fue *A sp A-01*.

Para el beta-naftol este fue completamente tóxico (no permitió crecimiento) a la concentración intermedia y la más alta, la cepa que menos efecto tóxico presentó fue *P. pinophilum*, y la que más efecto tóxico presentó fue *P. chrysosporium*.

En medio líquido se observó un efecto tóxico en función de la polaridad del hidrocarburo, siendo el más tóxico beta-naftol, el fenantreno y el hexadecano no presentan ningún efecto tóxico bajo las condiciones experimentales probadas, esto puede deberse a su solubilidad en medio líquido.

Cuando se ensayaron todas las cepas en tubo solo el beta-naftol presentó un efecto tóxico a la concentración más alta (no hubo crecimiento), en los experimentos de cepas por separado la mayor biodegradación de fenantreno se obtuvo con *A. niger* y *A. sp B-03*, el beta-naftol fue tóxico para *P. chrysosporium*, para el cual inhibió completamente el crecimiento, la cepa que mas degradó beta-naftol fue *A. niger*.

9. Recomendaciones

El presente estudio se realizó para medir la toxicidad de tres hidrocarburos modelo, los estudios de biodegradación fueron más limitados por cuestiones de tiempo, podría ser interesante realizar más estudios de biodegradación en los que se evaluara el efecto tóxico del hidrocarburo pero esta vez sólo sobre micelio y sólo sobre esporas, para ver si los hidrocarburos afectan por igual a ambos ya que en estos experimentos no se separaron los dos a la perfección como puede hacerse actualmente usando algunas técnicas de biología molecular. También sería interesante estudiar más moléculas modelo para ver si las hipótesis aquí propuestas siguen reproduciendo.

En los estudios de toxicidad en caja Petri tal vez se podrían ver los cambios químicos en los hidrocarburos asperjados usando microscopia de mapeo por FTIR o raman, ya que estas nuevas tecnologías permiten ver los cambios químicos de una molécula en una superficie.

10. Referencias bibliograficas

Baker K.H. y Hersons D.S. (1994). Biorremediation. Mc Graw Hill, USA. Págs. 97- 172

Belinky P.A., Flikshtein N, Lechenko S., Gepstein S. y Dosoretz C.G.(2003). Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 69: 6500-6506.

Bezalel L., Hadar Y. y Cerniglia C.E. (1996 a). Mineralization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 62: 292-295.

Bezalel L., Hadar Y. y Cerniglia C.E. (1997). Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 63: 2495-2501.

Bezalel L., Hadar Y., Fu PP, Freeman J. P. y Cerniglia C.E. (1996 b). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 62: 2547-2553.

Bhosale S., Saratale G. y Govindwar S. (2006). Biotransformation enzymes in *Cunninghamella blakesleeana* (NCIM-687). Journal of Basic Microbiology. 46:444-448.

Bogan B.W. y Lamar R.T. (1995). One-electron oxidation in the degradation of cresosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 61:2631-2635.

Boonchan S., Britz M.L. y Stanley G.A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. Applied and environmental microbiology 66:1007-1019.

Brodkorb T. y Legge R. (1992). Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil-tar contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3117-3121.

Budavari S., Ed. (1996). *The Merck Index*. Merck Research Laboratories, Pags. 1096, 1241.

Bumpus J.A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:154-158

Bumpus J.A., Tien M., Wright D. y Aust S.D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228:1434-1436.

Cameron M.D., Timofeevski S. y Aust S.D. (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54:751-758

Cerniglia C.E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 19: 324-333

Cerniglia C. E., Campbell W. L., Freeman J. P. y Evans F.E. (1989). Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2275-2279

Chávez-Gómez B., Quintero R., Esparza-García F., Mesta-Howard A. M., Zavala D. F. J., Hernández-Rodríguez C. H., Gillén T., Poggi-Varaldo H. M., Barrera-Cortés J. y Rodríguez-Vázquez R. (2003). Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Biorresource Technol.ogy* 89:177-83.

Conesa A., Jenés D., Archer D.B., Van den Hondel C.A.M.J. y Punt P.J. (2002). Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 846-851.

Conesa A., Van den Hondel C.A.M.J. y J. Punt P. (2000). Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3016-3023.

D'Annibale A., Ricci M., Leonardi V., Quarantino D., Mincione E. y Petruccioli M. (2005). Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering*. 90:723-731

D'Annibale A., Rosetto F., Leonardi V., Federici F., y Petruccioli M. (2006). Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 28-36.

Dhawale S.W., Dhawale S.S. y Dean-Ross D. (1992). Degradation of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3000-3006.

Doddapaneni H, Yadav J.S. (2005). Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Molecular Genetics Genomics*. 274:454-66.

Dosoretz C.G., Chen H. y Grethlein H. (1990 a). Effect of environmental conditions on extracellular Protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:2219-2226

Dosoretz C.G., Dass B.S. y Reddy A.C., (1990 b). Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology 56:3429-3434.

Elshafie, A. Yahya A. A., Al Busaidi, Bakheit C. y Albahry S. N. (2007). Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman Marine Pollution Bulletin 54:1692-1696

Friedrich M., Grosser R.J., Kern E.A., Inskip W.P. y Ward D.M. (2000). Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: Molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. Applied and Environmental Microbiol. 66: 2703-2710.

Grady L.C.P. (1985). Biodegradation: its measurement and microbiological basis. Biotechnology and Bioengineering Vol. XXVII: 660-674.

Hage A., Schoemaker H.E., Wever R., Zennaro E. y Heipieper H.J. (2000). Determination of the toxicity of several aromatic carbonylic compounds and their reduced derivatives on *Phanerochaete chrysosporium* using a *Pseudomonas putida* test system. Biotechnology and Bioengineering 73:69-73.

Han M. J., Choi H.T. y Song H.G. (2004). Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. Journal of Microbiology 42:94-8.

Heipieper H.J., Weber F. J., Sikkema J., Keweloh H. y Bont J. (1994). Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. Reviews 12:409-415.

Jeffy B.D., Chirmomas R.B. y Romagnolo D.F. (2002). Epigenetics of breast cancer: polycyclic aromatic hydrocarbons as risk factors Environmental and Molecular Mutagenesis. 39:235-244.

Johannes C. y Majcherczyk A. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 524-528.

Kanaly R.A. y Hur Hor-Gil (2006). Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH. *Chemosphere* 63:202-211.

Kersten P. y Cullen D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* Fungal. Genetics and Biology 44:77-87.

Kuhn A, Ballach H.J. y Wittig R. (2004). Studies in the biodegradation of 5 PAHs (phenanthrene, pyrene, fluoranthene, chrysene und benzo(a)pyrene) in the presence of rooted poplar cuttings. *Environmental Science and Pollution Research International*. 11:22-32.

Lamar R.T., White R.B. y Ashley K.C. (2002). Evaluation of white-rot fungi for the remediation of creosote-contaminated soil. *Remediation Journal* 12:97-106.

Larrondo L.F., Lobos S., Stewart P., Cullen D. y Vicuña R. (2001). Isoenzyme multiplicity and characterization of recombinant manganese peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2070-2075.

Larrondo L.F., Salas L., Melo F., Vicuña R., y Cullen D. (2003). A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6257-6263.

Leglize P., Saada A., Berthelin J. y Leyval C. (2006). Evaluation of matrices for the sorption and biodegradation of phenanthrene. *Water Research* 40:2397-2404.

Lide D. R., Ed. (1999). CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press. Pag. 16-42

Lisowska K. y D ugo ski J. (2003). Concurrent corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 85:63-69.

Lisowska K., Bizukojc M. y Długoński J. (2006). An unstructured model for studies on phenanthrene bioconversion by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. Enzyme and Microbial Technology 39:1464-1470.

Napola A., Pizzigallo M.D.R., Di Leo P., Spagnuolo M. y Ruggiero P. (2006). Mechanochemical approach to remove phenanthrene from a contaminated soil. Chemosphere 65:1583-1590.

Ouyang J. y Fitzgerald M. 2008. Biocatalysis/biodegradation database. Universidad de Minesota (Disponible en http://umbbd.msi.umn.edu/pha2/pha2_map.html, consultado el 1 de Mayo de 2008)

Pease E.A. y Tien M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of bacteriology. 174: 3532-3540.

Pothuluri J. V., Freeman J. P., Evans F.E. y Cerniglia C. E. (1990). Fungal transformation of fluoranthene. Applied and Environmental Microbiology 56: 2974-2983

Pothuluri J. V., Freeman J. P., Evans F. E., y Cerniglia C. E. (1993). Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*. Applied and Environmental Microbiology 59: 1977-1980.

Pothuluri J. V., Heflich R. H. , Fu P. P. y Cerniglia C. E. (1992). Fungal metabolism and detoxification of fluoranthene. Applied and Environmental Microbiology 58: 937-941

Pozdnyakova N.N., Rodakiewicz-Nowak J., Turkovskaya O.V. y Haber J. (2006a). Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 39:1242-1249.

Pozdnyakova N.N., Rodakiewicz-Nowak J., Turkovskaya O.V. y Haber J. (2006b). Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons and their derivatives catalyzed directly by the yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular Catalysis Enzymatic* 41: 8-15.

Reid B.J., Fermor T.R. y Semple K.T. (2002). Induction of PAH-catabolism in mushroom compost and its use in the biodegradation of soil-associated phenanthrene. *Environmental Pollution* 118:65-73.

Sack U., Heinze T.M., Deck J., Cerniglia C.E., Cazau M.C. y Fritsche W. (1997 a). Novel metabolism in phenantrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 63:2906-2909.

Sack U., Heinze T.M., Deck J., Cerniglia C.E., Martens R., Zadrazil F. y Fritsche W. (1997 b). Comparison of phenantrene and pyrene degradation by different wood decaying fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3919-3925.

Shiaris M.P. y Cooney J.J. (1983). Replica plating method for estimating phenantrene-utilizing and phenantrene-cometabolizing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 45:706-710.

Shin k., Kim k. y Ahn Y. (2006). Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization–biodegradation process. *Journal of Hazardous Materials* 137:1831-1837.

Singleton I., (1994). Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59:9-23.

Stucki G. y Alexander M. (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 53:292-297.

Sutherland J.B., Fu P. P. Yang S. K., Von Tungeln L. S., Casillas R. P., Crow S. A., y Cerniglia S. E. (1993). Enantiomeric composition of the trans-dihydrodiols produced from phenanthrene by fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2145-2149.

Sutherland J.R., Selby A.L., Freeman J.P., Evans F.E. y Cerniglia C.E. (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3310-3316.

Tang Y., Qi L. y Krieger-Brockett B. (2005) Evaluating factors that influence microbial phenanthrene biodegradation rates by regression with categorical variables. *Chemosphere* 59:729-741.

Terrazas-Siles E, Alvarez T, Guieysse B y Mattiasson B. (2005). Isolation and characterization of a white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain capable of oxidizing phenanthrene. *Biotechnology Letters* 27:845-51.

Thomas J.M., Yordy J. R. Amador J.A. y Alexander M. (1986). Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 52:290-296.

Tien M. y Kirk T.K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in enzymology*. 161:238-249.

Valentín L., Feijoo G., Moreira M. T. y Lema J. M. (2006). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi

International Biodeterioration and Biodegradation 58:15-21

Venkataramani E.S. y Ahlert R.C. (1985). Role of cometabolism in biological oxidation of synthetic compounds. *Biotechnology and bioengineering* Vol. XXVII, 1306-1311.

Voet D. y Voet J. G. (1995). *Biochemistry*. John Wiley and sons, Inc Pags. 667-669.

Volkering F., Breure A.M., Van Andel J.G., y Rulkens W.H. (1995). Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1699-1705.

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

Volke Sepulveda T, Gutierrez Rojas M, Favela Torres E. (2005). Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: kinetic analysis. *E. Bioresource Technology* 14:1583-91.

Wackett L.P. y Hershberger C.D. (2001). *Biocatalysis and biodegradation*. ASM Press Pags. 104-105

Watts R. J. y Stanton P. C. (1999) Mineralization of sorbed and NAPL-phase hexadecane by catalyzed hydrogen peroxide. *Water research*. 33:1405-1414

Wilcke W. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163:229-248.

Yadav J.S., Lawrence D.L., Nuck B.A., Federle T.W. y Reddy C.A (2001). Biotransformation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by *Phanerochaete chrysosporium*: oxidation of alkyl side-chain. *Biodegradation*. 12:443-53.

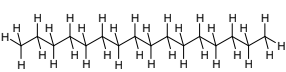
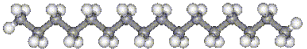
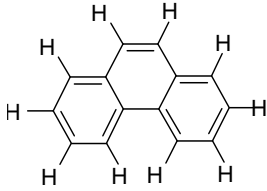
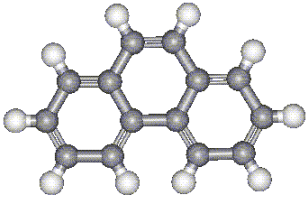
Zhao B., Zhu L., Li W. y Chen B. (2005). Solubilization and biodegradation of phenanthrene in mixed anionic–nonionic surfactant solutions. *Chemosphere* 58:33-40.

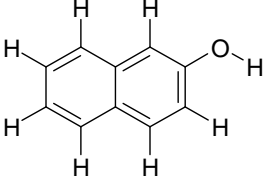
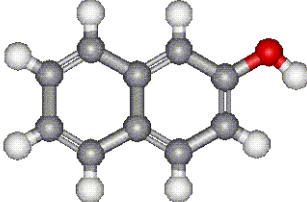
Zhao X. y Yang G. (2002). Study on the sorption of 2-naphthol on marine sediments. *colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 211:259-266.

Zheng Z. y Obbard J.P. (2002). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology* 31:3-9.

Zuleta V.C.M.. (1998). Desulfuración de dibenzotiofeno por hongos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de maestría en biología experimental. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

11. Anexo

<p>n- Hexadecano $C_{16}H_{34}$</p>			<p>P.M. 226.43 d^{20} 0.774 P.F. 18.5 °C P. E. 287.5 °C Insoluble en agua. Infinitamente soluble en alcohol y éter.</p>
<p>Fenantreno $C_{14}H_{10}$</p>			<p>P.M. 178.22 C 94.34% H 5.66% Cristaliza en cristales monoclínicos desde alcohol. d^{25} 1.179 P. F. 100 ° C P. eb. 340 °C Insoluble en agua, soluble en hidrocarburos aromáticos. 1 g. se disuelve en 60 ml de alcohol frío, 10 ml. de alcohol frío al 95%, 25 ml de alcohol absoluto, 2.4 ml de tolueno o CCl_4, 2 ml de benceno, 1 ml. de CS_2, 3.3 ml de éter anhidro, soluble en ácido acético glacial. L.D. $_{50}$ oral en ratones 700 mg/Kg.</p>

<p>β-naftol $C_{10}H_8O$</p>			<p>2-naftol P.M. 144.16 C 83.31 % H 5.59% O 11.10% P.F. 121.23 °C P. E. 285-286 °C d^{25}: 1.22 Punto de flash: 161 °C Solubilidad: 1 g. en 1000 ml. de agua, 80 ml. de agua hirviendo, 0.8 ml. de alcohol, 17 ml. de cloroformo, 1.3 ml. de éter,.</p>
--	---	--	--

Significado de algunas abreviaciones:

P.M. Peso molecular.

P.F. Punto de fusión.

P. E. Punto de ebullición.

d Densidad

Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

ESTUDIOS DE TOXICIDAD Y BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS
MODELO EN HONGOS FILAMENTOSOS




Presenta:
I.B.Q. Yuri Castro Riquelme

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Dr. Ernesto Favela Torres

Director
Asesor

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

México, D.F. Octubre 2008

Jurado
Ernesto Favela T. 
Araceli Tomesini 
Magda Braciz 
Alejandro Medina 