



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

CBS

Obtención y caracterización de un soporte sólido modelo para el estudio del metabolismo de hongos filamentosos degradadores de fenantreno.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M.B. MARÍA DEL ROSARIO PERALTA PÉREZ

COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - F

Comité Tutorial.

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas Director de Tesis

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda Asesor

Dr. Antonio Campero Celis Asesor

2001

225705

El jurado designado por las
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de la Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

María del Rosario Peralta Pérez

El día 22 de junio del 2001.

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

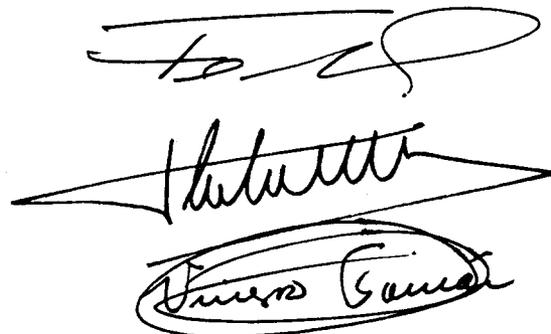
Asesor: Dr. Antonio Campero Celis



Sinodal: Dr. Fernando Esparza García

Sinodal: Dr. Frederic Thalasso

Sinodal: Dr. Tomás Viveros García



La tesis esta dedicada, en primer lugar, a mi esposo: Luis Oscar. No sólo estuvo en casa alentándome a seguir adelante, sino que me acompañó en cada nuevo experimento, en cada error y en cada acierto; fue mi principal consejero y crítico. Debo agradecerle su enorme paciencia y comprensión durante estos tres años de matrimonio, durante los cuales también se desarrolló este trabajo.

Luis Oscar: gracias por ayudarme a recordar que después de una tormenta siempre aparece un grandioso arcoiris, gracias por ser el hombre maravilloso dispuesto a dar y compartir, dispuesto a escuchar y entender. Gracias, simplemente por estar a mi lado y tenderme la mano para dar cada paso importante en la vida. Te amo.

Indudablemente llegar hasta este punto ha sido una labor de mucho tiempo que inició con la educación fundamental y la formación de hábitos. En este sentido, debo agradecer a mi mamá y a mi tía por haberme cuidado y apoyado todos estos años. Gracias a las dos por enseñarme que en la vida no existen más límites que los que nosotros mismos nos imponemos.

En este momento debo agradecer a mi familia entera por su comprensión, cariño y palabras de apoyo a lo largo de todo mi desarrollo profesional. Si no fuera por ustedes esto no sería posible.

Con especial cariño recuerdo en este momento a Judith, mi amiga. No existen palabras para describir lo importante de tu amistad durante estos extraordinarios once años; nos conocimos teniendo una vaga idea de lo que queríamos hacer de nuestras vidas y hemos estado juntas dándole forma a esos ideales. Indudablemente tu ayuda durante todo este tiempo ha sido fundamental para cerrar una etapa más en mi vida profesional.

Un importante logro durante el desarrollo de esta tesis fue, sin duda, conocer amigos sinceros que me ayudaron en todo momento. Por esta razón, también dedico este trabajo a Erika, Ildefonso, Alejandro y Angélica; gracias por su amistad y su apoyo incondicional, gracias por sus críticas y consejos ya que los verdaderos amigos son capaces de señalar lo que está mal y de aplaudir lo que está bien.

Aunque a Gerardo y Aurora los conocí al final de este largo camino no por eso son menos importantes; por el contrario, su amor a la investigación, su interés y entusiasmo me animó a dar el paso final buscando nuevas alternativas; gracias por brindarme su amistad y confianza.

INDICE DE CONTENIDO

Indice de contenido	<i>i</i>
Agradecimientos	<i>iv</i>
Resumen	<i>v</i>
Abstract	<i>vi</i>
Glosario de Términos	<i>vii</i>
1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	3
2.1. Contaminación de suelos	3
2.2. Transferencia de masa	3
2.3 Hidrocarburos poliaromáticos	7
2.4. Microorganismos degradadores de fenantreno	9
2.4.1. Bacterias	10
2.4.2. Hongos filamentosos	11
2.5. Estudios de biodegradación de fenantreno en cultivos líquidos	13
2.5.1. Rutas metabólicas	14
2.5.2. Biotransformación cometabólica de fenantreno	16
2.6. Fermenta en medio sólido (FMS)	17
2.7. Utilización de soportes sólidos modelo	18
2.8. Tecnología sol-gel	19
3. Justificación	22
4. Objetivos	24
4.1. Objetivo General	24
4.2. Objetivos Particulares	24
5. Materiales y Métodos	25
5.1. Reactivos	25
5.2. Microorganismos y conservación de cepas	25

5.3. Cosecha y conteo de esporas	26
5.4. Síntesis del xerogel de SiO ₂	27
5.5. Propiedades fisicoquímicas del xerogel	29
5.6. Cultivo sólido	30
5.7. Cultivo líquido	31
5.7.1. Medio de cultivo	31
5.7.2. Estudio de sorción y biotransformación de fenantreno	32
5.7.3. Cinética de crecimiento y biotransformación de fenantreno en medio líquido	32
5.8. Análisis fisicoquímicos	32
5.8.1. pH	33
5.8.2. Azúcares reductores	33
5.8.3. Cuantificación de biomasa en cultivo líquido	33
5.8.4. Humedad	34
5.8.5. Extracción de fenantreno	34
5.8.6. Detección de fenantreno por ultravioleta	35
5.8.7. Cuantificación de fenantreno por cromatografía de líquidos de alta resolución	36
5.8.8. Balances de fenantreno	37
5.8.9. Tratamiento de muestras para la observación al microscopio electrónico	37
Resultados y Discusión:	
6. Caracterización del xerogel de SiO ₂ como soporte para el cultivo sólido	39
6.1. Condiciones de obtención del xerogel de SiO ₂	39
6.2. Porosidad y área superficial de un xerogel sin fenantreno	42
6.3. Porosidad y área superficial del xerogel con fenantreno	43
6.4. Extracción y cuantificación de fenantreno	49
6.5. Conclusiones	51
7. Colonización del soporte por los hongos filamentosos	52

7.1. Cinética de crecimiento sobre el soporte sin fenantreno	52
7.2. Cinética de crecimiento sobre el soporte con fenantreno	59
7.3. Conclusiones	66
8. Estudios en medio líquido	67
8.1. Evaluación de la capacidad de transformación de fenantreno por <i>P. chrysosporium</i> A594 y <i>A. niger</i> ATCC9642.	67
8.2. Evaluación de la sorción de fenantreno en la biomasa	71
8.3. Cinética de sorción y biotransformación de fenantreno en medio líquido	77
8.4. Conclusiones	81
9. Comparación de los mecanismos empleados por los hongos filamentosos para la biotransformación de fenantreno en cultivo líquido y sólido	82
9.1. Consumo de fenantreno y velocidades máximas de consumo en cultivo líquido y sólido	82
9.2. Conclusión	86
10. Conclusión general	87
11. Recomendaciones	89
12. Bibliografía	91
Apéndice A. Técnicas analíticas para la extracción y cuantificación de fenantreno	I
Apéndice B. Transformación abiótica del fenantreno	IV
Apéndice C. SiO ₂ : Importancia del área superficial y la porosidad de los materiales	VIII
Artículo: "SiO ₂ xerogel: A Suitable Inert Support for Microbial Growth"	XII

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo inicialmente en la Planta Piloto de Fermentaciones Sólidas y después en el Laboratorio de Residuos Sólidos, Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Iztapalapa) bajo la dirección del Dr. Mariano Gutiérrez Rojas y la asesoría del Dr. Gerardo Saucedo Castañeda y el Dr. Antonio Campero Celis a quienes agradezco profundamente su apoyo y confianza para la realización de este proyecto.

El trabajo fue financiado por el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP FIES-96-48-VI) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT través de la beca 90855/114822).

A los sinodales de la tesis: Dr. Fernando Esparza García, Dr. Frederic Thalasso y Dr. Tomás Viveros García agradezco su paciencia y cuidado en la revisión del escrito así como también sus comentarios y sugerencias las cuales, sin duda alguna, ayudaron a mejorar notablemente el escrito final.

Una especial mención y agradecimiento al Dr. José David Sepúlveda Sánchez por la ayuda y asesoría brindada en el procesamiento y análisis de las muestras en el Microscopio Electrónico de Barrido así como a la M. en C. Carmen Fajardo Ortiz por su ayuda en el montaje de la técnica de cuantificación de fenantreno por Cromatografía de Líquidos de Alta Precisión.

A la Dra. Judith Guzmán Rincón y al Dr. Javier Espinoza Aguirre agradezco profundamente su apoyo incondicional.

RESUMEN

Se prepararon xerogeles de SiO₂ con un tamaño promedio de poros de 30 Å y un área superficial de 759 m²/g; también se prepararon xerogeles de SiO₂ adicionando durante la polimerización una solución de fenantreno (FE) en dimetilformamida obteniéndose xerogeles con un tamaño promedio de poros de 89Å y un área superficial de 429 m²/g, a estos xerogeles se les añadió nuevamente fenantreno hasta alcanzar una concentración inicial de 250 ppm. Estos xerogeles tuvieron una capacidad de retención de agua promedio de 4.2±1.3 g de agua/g material. Y fueron usados como soporte para el crecimiento de dos hongos filamentosos, *Phanerochaete chrysosporium* A594 y *Aspergillus niger* ATCC9642.

Tanto en los xerogeles preparados con fenantreno como en los que no tenían esta molécula modelo, los microorganismos crecieron presentando una velocidad promedio de consumo de azúcares reductores de 0.046 mg/g soporte h para *P. chrysosporium* A594 y de 0.106 mg/g soporte h para *A. niger* ATCC9642. Estos resultados indican que no existen efectos inhibitorios ni en el crecimiento de los hongos ni en el consumo de azúcares por la presencia de fenantreno (al menos hasta 250 ppm). Los hongos tampoco presentaron modificaciones importantes en la morfología observada con el microscopio electrónico de barrido; sin embargo, la biotransformación del fenantreno fue de sólo 25% en diez días.

Las cinéticas de sorción y biotransformación de fenantreno en cultivo líquido, mostraron que *P. chrysosporium* A594 y *Aspergillus niger* ATCC9642 sorben un máximo de 0.02 y 0.013 mg FE/mg biomasa respectivamente y biodegradan un máximo de 0.02 y 0.025 mg FE/mg biomasa, respectivamente. Ambos fenómenos se encuentran íntimamente relacionados; lo cual sugiere que es necesaria la sorción inicial del compuesto para que posteriormente se biotransforme. Es posible que este mismo fenómeno se presente en los sistemas sólidos lo cual contribuye a explicar, junto con los modelos clásicos de transferencia de masa, la lenta biotransformación de los contaminantes por la microflora nativa.

ABSTRACT

SiO₂ xerogels with an average pore size of 30 Å and a surface area of 759 m²/g were prepared; SiO₂ xerogels were also prepared adding a solution of phenanthrene in dimethylformamide during the polymerization yielding xerogels with an average pore size of 89 Å and a surface area of 429 m²/g, more phenanthrene was added to these xerogels until a concentration of 250 ppm was reached. All xerogels prepared had an average water retention capacity of 4.2±1.3 g water/g xerogel.

The xerogels were used as support for the growth of two filamentous fungi, *Phanerochaete chrysosporium* A594 and *Aspergillus niger* ATCC9642. In both xerogels the microorganisms had an average rate of reducing sugar consumption of 0.046 mg/g support h for *P. chrysosporium* A594 and of 0.106 mg/g support h for *A. niger* ATCC9642. These results show that, at an initial concentration of 250 ppm, phenanthrene has no inhibiting effect neither in the growth of the fungi, nor in its sugar consumption. No significant changes on the morphology of the fungi were observed using scanning electron microscopy. Despite the fact that neither the physiology nor the morphology of the fungi were affected, the phenanthrene biotransformation was only 25% after ten days.

Phenanthrene sorption and biotransformation kinetics in liquid culture showed that *P. chrysosporium* A594 and *A. niger* ATCC9642 sorb a maximum of 0.02 and 0.025 mg phenanthrene/mg biomass respectively. Both phenomena are closely related, which suggests that an initial sorption of the compound is necessary before its biotransformation. It is possible that the same phenomenon is present in the solid systems, which together with the classical mass transference models helps to explain the slow biotransformation of the pollutants by the indigenous microflora.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Biomasa. Cuerpos celulares. En este trabajo se considera como “*biomasa*” al micelio total producido por los hongos filamentosos que se emplearon.

Biotransformación. Transformación química de un compuesto catalizada por un organismo vivo.

Cometabolismo. Es la transformación biológica de un compuesto (cosustrato o cometabolito) incapaz de mantener por sí mismo la replicación celular, en presencia obligada de un sustrato de crecimiento o suministrador de energía

Cuerpos fructíferos. Estructura reproductiva macroscópica producida por algunos hongos (por ejemplo esporangios). Los cuerpos fructíferos son de diferente tamaño, forma y color, de acuerdo a la especie.

Enzimas. Proteína que funciona como catalizador en los organismos vivientes, provocando reacciones específicas.

Esporangio. Envoltura en la que se forman las esporas.

Esporas. Nombre general de las estructuras resistentes en reposo, formadas por los hongos y bacterias.

Gel. Polímero producido a temperatura ambiente.

Hifa. Filamento largo y ramificado emitido por las esporas después de que éstas germinan.

Hongos filamentosos. Organismos no fotosintéticos que poseen una estructura vegetativa denominada micelio.

Micelio. Sistema ramificado de hifas. Masa de citoplasma multinucleado encerrada dentro de un sistema de tubos rígidos y ramificados.

Mineralización. Es cuando los microorganismos oxidan un compuesto complejo de carbono por completo; llegando a producirse CO_2 , H_2O y energía empleada para la actividad celular.

Recalcitrante. Se refiere a compuestos que permanecen en el suelo, o en el agua, por largos periodos de tiempo sin sufrir ningún tipo de transformación en su estructura molecular.

Xerogel. Gel calentado a 60 - 80 °C. Debido a que pierde humedad, se vuelve quebradizo.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN.

La contaminación ambiental es uno de los problemas más severos que enfrenta nuestra sociedad actualmente. El problema se presenta tanto en ambientes terrestres como acuáticos, por lo cual han surgido nuevas alternativas para combatirla, una de ellas es la biorremediación.

Sin embargo, en sistemas física y químicamente complejos como los suelos, aplicar este tipo de alternativas no ha sido sencillo. Los problemas de transferencia de masa así como la complejidad y heterogeneidad de los materiales son dificultades que a menudo se encuentran al tratar de entender este tipo de sistemas.

En los estudios de biorremediación, la atención se ha centrado principalmente en el estudio de las bacterias, aunque los hongos filamentosos tienen una gran capacidad de supervivencia en sistemas con bajas humedades, y esto los hace muy atractivos para la biorremediación de suelos.

Por todo lo anterior, resulta interesante utilizar sistemas modelos similares a los suelos a fin de estudiar los procesos microbianos en condiciones más fáciles de controlar. El presente trabajo propone el uso de la química sol-gel para obtener polímeros de SiO_2 con una molécula modelo (fenantreno) como un sistema simplificado de un suelo contaminado con alto contenido mineral, empleando como microorganismos a dos hongos filamentosos: el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* y el deuteromiceto *Aspergillus niger*, ambos hongos han sido reportados como degradadores de fenantreno.

El estudio se dividió en tres etapas:

1. Se estudiaron y eligieron las mejores condiciones para la obtención de los xerogeles de SiO_2 , analizando sus propiedades fisicoquímicas para elegir

finalmente aquél que brindaba las mejores condiciones para el desarrollo de los hongos.

2. Se estudió la colonización del soporte por los hongos en ausencia de fenantreno, observándose la morfología de los hongos en el microscopio electrónico de barrido y cuantificando el consumo de azúcares. Una vez que se confirmó que el xerogel de SiO_2 podía servir como soporte para el crecimiento de hongos filamentosos, se procedió a impregnarlo con fenantreno y realizar nuevamente cinéticas de consumo de azúcares y fenantreno observando la morfología de los microorganismos para compararla con los experimentos realizados en ausencia de fenantreno.
3. Finalmente se realizaron cultivos líquidos de los dos hongos cuantificando la producción de biomasa, el consumo de azúcares y el consumo de fenantreno. En estos experimentos se cuantificó el fenantreno sorbido en la biomasa, lo cual facilitó hacer balances de masa. Estos experimentos permitieron sugerir un modelo para la biotransformación del fenantreno por hongos filamentosos.

El presente trabajo representa una propuesta novedosa para el uso de los procesos sol-gel en sistemas biológicos, y es un estudio inicial que pretende ayudar a comprender los complejos fenómenos que tienen lugar en los suelos contaminados. Además es una aportación para entender los mecanismos que tienen los hongos para la biotransformación de moléculas no solubles en agua como el fenantreno.

Revisión Bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Contaminación de suelos.

Uno de los mayores problemas que enfrenta la industria mundial en nuestros días es la contaminación de suelos, agua subterránea y superficial, sedimentos y aire con residuos químicos tóxicos y peligrosos. Se calcula que en los Estados Unidos la generación de desechos peligrosos anual asciende a 100 millones de toneladas, el costo de limpieza total es cercano a los \$1.7 billones (de dólares); además, la presencia de dichos residuos representa un grave peligro para la flora y fauna nativa del sitio contaminado y para los seres humanos. En términos generales, los sitios contaminados contienen mezclas complejas de compuestos orgánicos como el creosote, combustibles, combinaciones de solventes industriales, petróleo crudo, entre otros. Las concentraciones individuales de cada contaminante varían dependiendo del sitio contaminado (Baker y Herson, 1994).

Entre los problemas más graves se encuentran las contaminaciones por manufactura, transportación y distribución del petróleo y los productos químicos derivados de estas actividades así como los desechos provenientes del tratamiento de la madera. Un ejemplo de este problema, es el hecho de que en los años 80's, Estados Unidos tenía 2.3 millones de pozos petroleros abandonados y la cantidad de las fugas se desconocía. Por esta razón el problema ha llamado fuertemente la atención de los científicos desde hace varios años.

Con la finalidad de resolver estos problemas de contaminación han surgido nuevas tecnologías, una de ellas es la **biorremediación** que puede definirse como el uso de microorganismos o procesos microbianos para destoxificar o degradar contaminantes ambientales.

2.2. TRANSFERENCIA DE MASA.

Los procesos de biorremediación en los suelos son prolongados y a veces poco exitosos, esto se ha atribuido a que existe la posibilidad de que los microorganismos

responsables de la biodegradación no se encuentren en el sitio que se desea limpiar o bien que no tengan las condiciones adecuadas para su desarrollo (Harms y Bosma, 1997; Aitken y col, 1998). Además, los suelos son ambientes física y químicamente complejos, esto provoca la disminución de la biodisponibilidad de compuestos contaminantes.

Por lo anterior, definir con claridad el proceso o procesos que disminuyen la biodisponibilidad resulta muy complicado, sobre todo considerando que actúan en forma simultánea factores físicos, químicos y biológicos (Nam y Alexander, 1998). A pesar de todas estas dificultades, en nuestros días las técnicas de biorremediación se emplean extensamente y sus dificultades se explican en términos de dos fenómenos (Huesemann, 1997):

1. Los hidrocarburos que permanecen en el sitio son *recalcitrantes*, es decir, bajo las condiciones ensayadas no es posible biodegradarlos.
2. Los hidrocarburos son secuestrados por el suelo, están inaccesibles para los microorganismos.

Aunque es difícil determinar con exactitud cuál de estos factores es el que predomina, se ha hecho un extenso trabajo sobre sorción de moléculas orgánicas en los suelos; por lo tanto, entender la dinámica de la sorción es de suma importancia en el proceso. Existen muchas investigaciones que atribuyen la lenta sorción a limitaciones de difusión debido a la naturaleza de los poros de las partículas.

En la figura 2.1 se esquematiza un suelo (Pignatello y Xing, 1996); se puede observar que existen varios gránulos de diferentes tamaños formando cúmulos; un gránulo puede presentar algunas fisuras además de microporos y mesoporos. Los tamaños de estos poros son, de acuerdo a la IUPAC, mayores que 50 nm si son macroporos; 2-50 nm, mesoporos; y menores que 2 nm microporos. Como puede apreciarse, una molécula contaminante deberá difundir desde los micro o mesoporos hasta la capa exterior de agua donde, ya soluble, está biodisponible.

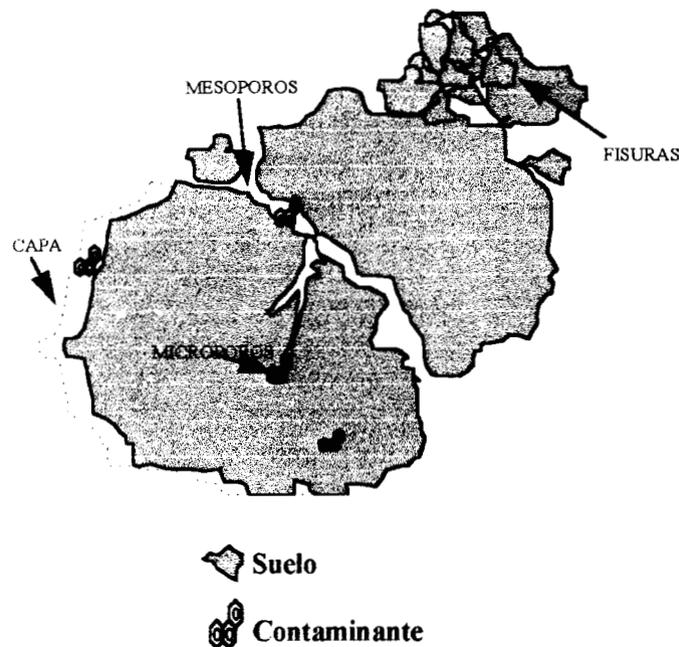


Figura 2.1. Representación esquemática de un agregado de suelo.

La sorción de los contaminantes en sólidos naturales afecta los procesos de transporte, degradación y actividad biológica de los compuestos orgánicos en el suelo; la sorción puede requerir de semanas o meses para llegar a un equilibrio (Pingnatello y Xing, 1996).

Aunque los mecanismos que gobiernan las velocidades de sorción no están bien establecidos, se han propuesto dos mecanismos para explicarlo (Pingnatello y Xing, 1996):

I. Difusión dentro de la materia orgánica (DMO). El modelo de DMO postula la difusión a través de los sólidos de la materia orgánica no soluble (MON) como el paso limitante; este es el mecanismo primario de sorción cuando la MON y el agua son suficientemente abundantes. La MON puede estar adherida a la superficie de las partículas de material inorgánico del suelo o como partículas discretas.

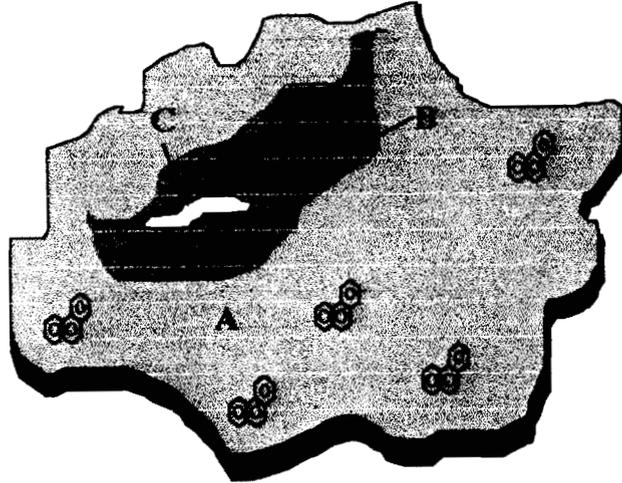


Figura 2.2. Esquema de la Difusión de la Materia Orgánica (DMO). A, difusión a través de la fase mineral menos condensada; B, difusión a través de la fase mineral más condensada; C, adsorción en un sitio tipo "Langmuir".

II. Modelo de Sorción-Difusión Retardada a través de Poros: Este modelo (SDRP) postula que el paso limitante es la difusión molecular del contaminante en los poros llenos de agua; es análogo a un proceso cromatográfico. Ocurre una sorción local en la pared de los poros; dichas paredes pueden o no estar compuestas por MON. De acuerdo a este modelo, las velocidades de desorción son inversamente dependientes del cuadrado del radio de la partícula, de la tortuosidad de los poros, de la constrictividad en los poros, y del coeficiente de distribución "fase sólida/fase solución" (K_d).

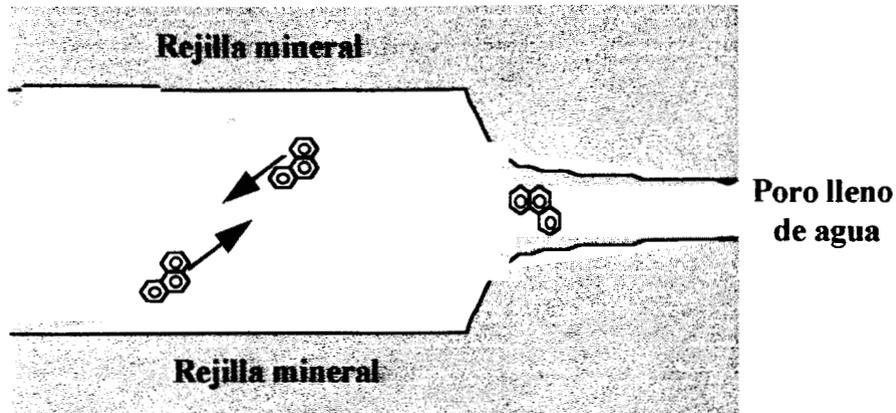


Figura 2.3. Esquema de la sorción-difusión retardada a través de poros (SDRP).

Las sílices pueden servir como modelo de un suelo ya que presentan un comportamiento similar en cuanto a la estructura y composición de la parte inorgánica, existen varios trabajos al respecto (Nam y Alexander, 1998; Farrel y col, 1999).

Los mecanismos de DMO y SDRP operan en forma simultánea en ambientes naturales; DMO puede predominar en suelos con alto contenido de materia orgánica, mientras que SDRP predomina en suelos donde la cantidad de materia orgánica es baja. Aparentemente, la lenta desorción de moléculas orgánicas a partir de sílices libres de materia orgánica puede acercarse mucho a simular suelos con una fracción mineral importante (Pignatello y Xing, 1996).

2.3. HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS.

Dentro del petróleo existe una fracción denominada **hidrocarburos poliaromáticos** (PAHs) que son moléculas de más de dos anillos bencénicos que pueden o no estar sustituidos, algunos son carcinógenos y debido a su elevado peso molecular son persistentes en el medio ambiente; por estas razones están incluidos como prioridad en la lista de contaminantes de la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) de los Estados Unidos (Pothuluri y col, 1995). Recientemente se ha empleado la técnica de la biorremediación para tratar suelos contaminados con este tipo de moléculas

(Hughes y col, 1997). Algunos ejemplos de estas moléculas se presentan en la figura 2.4.

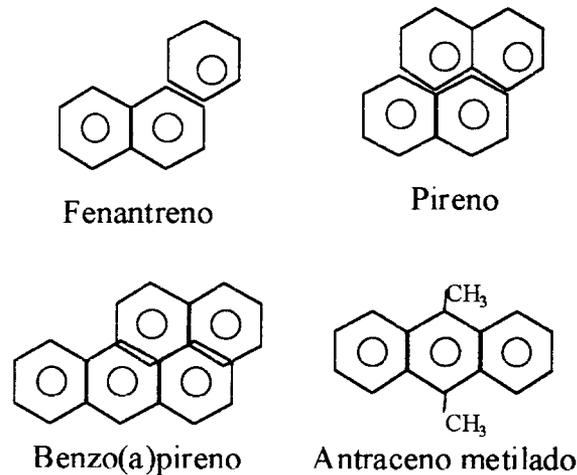


Figura 2.4. Estructura de moléculas de hidrocarburos poliaromáticos.

El fenantreno es uno de los PAHs más abundantes, generalmente en suelos contaminados se encuentra entre los cuatro PAHs más abundantes, incluso en suelos intemperizados (Weissenfels y col, 1992; Blumer y col, 1977); esto puede atribuirse a que se adsorbe rápidamente en ciertos tipos de suelos, lo cual afecta su disponibilidad para microorganismos, y algunos otros organismos propios de los suelos (Tang y col, 1998). Es un hidrocarburo tricíclico, no carcinógeno y su metabolismo ha llamado mucho la atención ya que aunque presenta el mismo tipo de arreglo que otros PAHs como el benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y 3-metilcolantreno, no es carcinógeno. El fenantreno resulta un excelente modelo de estudio para el metabolismo de los microorganismos, aunque pocas especies son capaces de oxidarlo (Cerniglia y col, 1992); además, su estudio resulta más sencillo en comparación a otros PAHs debido a su solubilidad en agua (1.29 mg/l) con respecto al antraceno (0.045 mg/l) y su característico espectro en ultravioleta (con un pico de máxima absorción entre 250 y 255 nm); por estas razones se ha tomado como modelo de estudio en diversos trabajos sobre contaminación y degradación de PAHs.

Los PAHs son contaminantes ampliamente distribuidos en los suelos, con efectos tóxicos y carcinógenos bien documentados (Lawlor y col., 1997). La eliminación biológica de los PAHs es lenta no sólo por su difícil biodegradación, sino también porque estos compuestos se adsorben con fuerza al suelo, ya sea en la materia orgánica, o bien, en los nanoporos de la parte inorgánica (Pignatello y Xing, 1996).

2.4. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE FENANTRENO.

Las transformaciones microbianas se consideran los procesos más importantes en la biotransformación y biodegradación de compuestos xenobióticos en suelos contaminados, incluyendo los PAHs. Esto se debe a que los microorganismos mineralizan los compuestos de interés, es decir, los oxidan hasta CO₂, y H₂O (Schwarzenbach y col, 1993).

La efectiva biorremoción de los PAHs presentes en los suelos está fuertemente influenciada por el contenido de humedad, la concentración de PAHs, condiciones redox, toxicidad de sedimentos, temperatura, pH, aceptores de electrones, contenido de materia orgánica del suelo, biodisponibilidad de nutrientes inorgánicos y las propiedades fisicoquímicas de los PAHs, entre otros.

Para llevar a cabo la biorremediación de sitios contaminados con petróleo se ha usado una amplia variedad de microorganismos. Se han estudiado diversos tipos de bacterias y hongos, los hongos filamentosos han llamado la atención debido a que son abundantes en los suelos y se han sugerido como buenos candidatos para la biorremediación.

La figura 2.5. resume los pasos generales para la biotransformación de PAHs por tres grupos diferentes de microorganismos (Cerniglia y col, 1993):

1. Las *bacterias* atacan los anillos aromáticos utilizando enzimas dioxigenasas, esto da lugar a la formación de dihidrodioles favoreciéndose la ruptura de los anillos. De este modo los PAHs pueden oxidarse hasta CO₂ y H₂O fácilmente.

2. Los hongos ligninolíticos, es decir, aquéllos que atacan a la lignina empleando enzimas ligninasas, peroxidadasas y lacasas pueden también llegar a degradar los PAHs hasta CO_2 y H_2O .
3. Los hongos no ligninolíticos atacan inicialmente a los PAHs a través de monooxigenasas, generalmente citocromo P-450, formando trans-dihidrodiol o fenoles, a su vez los fenoles pueden formar algún compuesto conjugado.

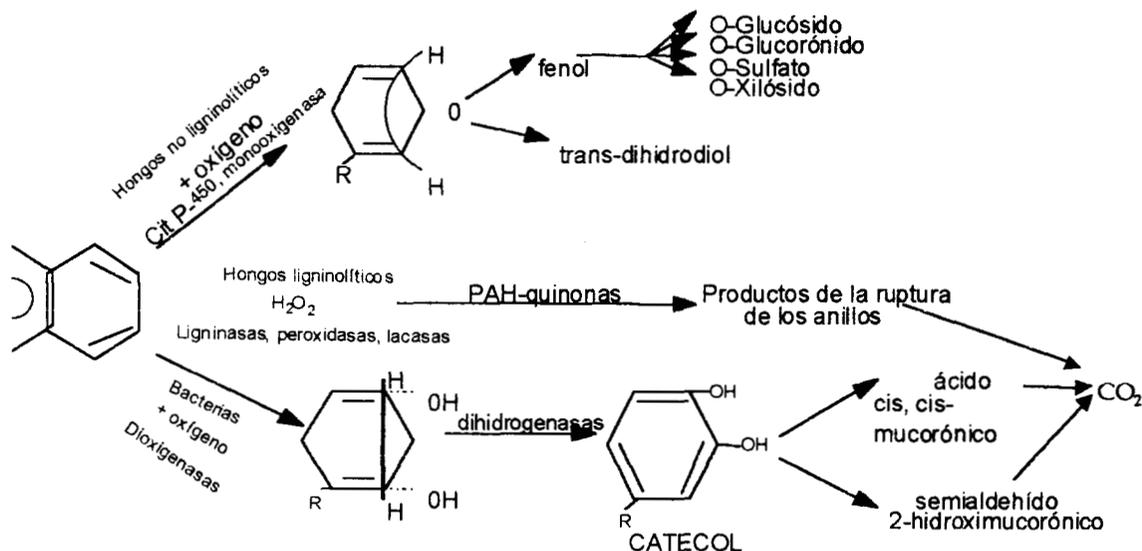


Figura 2.5. Pasos iniciales de la transformación de PAHs por microorganismos.

2.4.1. BACTERIAS.

A partir de suelos contaminados se han aislado bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas capaces de degradar de PAHs. Se estima que el contenido de bacterias degradadoras de PAHs en suelos contaminados asciende a una cuenta de 10^5 - 10^{10} bacterias/g suelo (Tresicka-Mlynarz y Ward, 1995; Aitken y col, 1998).

Algunas especies degradadoras de PAHs aisladas de suelos son: *Pseudomonas* sp, *Rhodococcus* sp. (Ko y Lebeault, 1997), *Alcaligenes* sp, *Beijerinckia* sp,

Mycobacterium sp., *Staphylococcus* sp. y *Arthrobacter* sp (Cerniglia, 1993). Estas cepas tienen la capacidad de degradar completamente o cometabolizar PAHs de elevado peso molecular incluyendo al fenantreno.

La degradación bacteriana de PAHs normalmente inicia con la actividad de enzimas dioxigenasas las cuales atacan a uno de los anillos aromáticos transformándolo a *cis*-dihidrodiol; también ha sido observada la formación de *trans*-dihidrodiol, esto se ha atribuido a la acción de monooxigenasas. Una vez que los anillos aromáticos se rompen se forman intermediarios del ciclo de Krebs que pueden ser metabolizados.

Las bacterias con capacidad de degradación de PAHs son capaces de atacar una amplia variedad de PAHs. El metabolismo de PAHs incluye crecimiento, oxidación parcial o mineralización en ausencia de crecimiento; se piensa que estas tres actividades ocurren simultáneamente en ambientes naturales contaminados con este tipo de moléculas (Aitken y col, 1998).

2.4.2. HONGOS FILAMENTOSOS.

El papel ecológico de los hongos saprófitos en la descomposición de polímeros complejos como la lignina y la celulosa es bien conocido. Estos hongos habitan naturalmente ambientes acuáticos, semiacuáticos y terrestres contaminados con hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Debido a que la mayoría de los hongos crecen más lentamente que el común de las bacterias, su uso en la biorremediación se había despreciado inicialmente, es por eso que el conocimiento del metabolismo de hongos es limitado. Sin embargo, en algunos ambientes las condiciones favorecen más el desarrollo de estos microorganismos, por ejemplo, en suelos ácidos (pH 4.0 – 5.0) los hongos son predominantes sobre las bacterias (Cerniglia y col, 1992).

A diferencia de las bacterias, los hongos no pueden usar PAHs como única fuente de carbono y energía, ellos los transforman en forma cometabólica.

La figura 2.5. muestra que hay dos principales grupos de enzimas involucradas en el ataque de PAHs por hongos: el citocromo P-450 monooxigenasa y la lignin

peroxidasa (LiP); ambas enzimas son relativamente no-específicas para los PAHs que metabolizan.

En los hongos no-ligninolíticos, el citocromo P-450 incorpora una molécula de oxígeno en la molécula de PAHs formando un óxido de areno el cual se isomeriza espontáneamente a un fenol; finalmente, la molécula se puede conjugar con sulfato, ácido glucorónico, glucosa o xilosa o bien, se hidrata dando lugar a la formación de dihidrodioles (ver Figura 2.5.). Se sabe que especies de *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., entre otras, son capaces de biotransformar PAHs por esta vía. En el hongo *Cunninghamella elegans* se ha reportado la presencia de enzimas epóxido hidrolasas, glutatión-S-transferasa y UDP-glucoronosiltransferasa que son capaces de atacar este tipo de compuestos (Wackett y Gibson, 1982).

Por otra parte, los hongos ligninolíticos, también llamados hongos de la pudrición blanca, producen lignin peroxidases y lacasas capaces de oxidar PAHs a través de un ataque vía radicales libres (Cerniglia, 1993). Las peroxidases que producen son extracelulares, lo que permite la degradación de muchos compuestos que son poco accesibles a causa de su insolubilidad o enlaces a los materiales del suelo, esto les permite tolerar concentraciones altas de compuestos tóxicos; además, no se requiere una adaptación al sustrato ya que las enzimas se sintetizan en respuesta al agotamiento de fuente de carbono, nitrógeno o azufre, y la actividad enzimática se presenta aún cuando la concentración del compuesto está a niveles bajos que no inducen la síntesis de enzimas comunes. Se ha demostrado que el sistema enzimático LiP y manganeso peroxidasa (MnP) se sintetiza en ausencia de lignina cuando el hongo crece en forma miceliar asociada a un cultivo no agitado, al agotarse la fuente de carbono, nitrógeno o azufre, ocurre la transición al metabolismo secundario con la subsecuente producción de metabolitos secundarios y del sistema ligninolítico (Faison y Kirk, 1985; Pease y Tien, 1992).

Algunos estudios han demostrado que este tipo de hongos son capaces de degradar PAHs presentes en aceite de antraceno (un producto obtenido de la destilación de alquitrán de carbón) en donde existen alrededor de 22 PAHs los cuales desaparecen

totalmente al cabo de 27 días de incubación en un medio limitado en nitrógeno (Bumpus, 1989).

Se han realizado estudios encaminados a aislar y probar cepas de hongos de la pudrición blanca que puedan biodegradar PAHs en forma más eficiente encontrándose que las mejores cepas son *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Bjerkandera adusta* (Field y col, 1992). De estos microorganismos el más estudiado es *Phanerochaete chrysosporium*.

Las peroxidases de *Phanerochaete chrysosporium* catalizan reacciones de oxidación que causan la despolimerización de la lignina, debido a que las reacciones no son específicas ni estereo-selectivas esto mismo es extrapolable a la ocurre con otras moléculas de difícil degradación como DDT, TCDD, benzopireno y lindano; es por esta razón que este hongo se propuso desde hace varios años para sistemas de biorremediación (Bumpus y col, 1985).

Los hongos representan un grupo interesante de estudio con gran potencial en la biotransformación y biodegradación de PAHs. Además tienen la enorme ventaja sobre las bacterias de colonizar los suelos y distribuirse a través de la matriz para degradar PAHs. Optimizar el potencial de biodegradación de los hongos requiere intensas investigaciones sobre las enzimas involucradas en el proceso así como de los mecanismos implicados.

2.5. ESTUDIOS DE BIODEGRADACIÓN DE FENANTRENO EN CULTIVOS LÍQUIDOS.

Debido a la complejidad de los suelos y a los problemas de transferencia de masa inherentes a estos sistemas, la mayoría de los estudios encaminados a la comprensión del metabolismo de PAHs se han realizado en cultivos líquidos bien controlados.

Los cultivos líquidos presentan la ventaja de tener menos barreras difusionales y son más simples y de composición definida, además se pueden controlar más fácilmente que los sistemas sólidos. Por esta razón el estudio específico de las rutas

metabólicas de los PAHs, incluyendo al fenantreno, se han realizado en cultivos líquidos y se sabe poco de los cultivos sólidos.

2.5.1. RUTAS METABÓLICAS.

En tanto que el fenantreno representa un excelente modelo de estudio, se conocen meticulosos trabajos acerca de las rutas metabólicas de su biodegradación.

En los últimos 10 años se han hecho esfuerzos por dilucidar la ruta de biotransformación de fenantreno por hongos filamentosos. Se ha encontrado que dependiendo del medio de cultivo se producen y acumulan algunos compuestos conjugados como glicósidos, glucorónidos y xilósidos (Wunder y col, 1994). En el hongo *Aspergillus niger*, cuya presencia en suelos es común, se ha detectado la presencia de algunos alcoholes como 1-fenantrol, 2- fenantrol y fenantreno *trans*-9,10 dihidrodiool (Casillas y col, 1996); y más recientemente Sack y col, (1997) encontraron 1-metoxifenantreno en el medio de cultivo lo cual resultó muy novedoso pues este compuesto únicamente había sido reportado en cepas de *Penicillium frequentans* y *Phanerochaete chrysosporium*.

Otro de los microorganismos más estudiados es *Phanerochaete chrysosporium*. Aunque las especies de *Phanerochaete* producen una gran variedad de enzimas extracelulares e inespecíficas, se ha reportado que el fenantreno no es sustrato de la LiP debido a que su potencial de ionización es de 8.19 eV y esta enzima oxida hidrocarburos poliaromáticos con potenciales de ionización por debajo de 7.54 (como el benzopireno y el pireno, cuyos potenciales de ionización son de 7.23 y 7.50 respectivamente) (Hammel y col, 1986). A pesar de esto, se ha observado que el fenantreno es metabolizado en condiciones ligninolíticas a fenantreno-9,10-quinona y luego a ácido 2,2'-difénico (Hammel y col, 1992; Moen y Hammel; 1994); mientras que en condiciones no ligninolíticas se obtiene *trans*-3,4- y *trans*-9,10-dihidrodioles, 3-, 4-, y 9-fenantrol y 9-fenantril- β -D-glucopiranosido (Sutherland y col, 1991). Esto hace suponer que el hongo tiene múltiples vías enzimáticas para el metabolismo del fenantreno. La degradación de fenantreno ocurre tanto en condiciones ligninolíticas

(con limitación de nitrógeno) como no ligninolíticas (con exceso de nitrógeno) y se mineraliza en ambos casos; en ninguno de los dos se detectó actividad LiP o MnP. Estos resultados confirman que en *P. chrysosporium* la degradación de fenantreno no está directamente asociada con la actividad ligninolítica del hongo además de que se propone que las enzimas involucradas en la biotransformación son monooxigenasas y epóxido hidrolasas, así que la presencia de fenantreno pudiera inducir la actividad monooxigenasa (Dhawale y col, 1992).

La figura 2.6. muestra el esquema propuesto para la biotransformación de fenantreno por *P. chrysosporium* bajo condiciones no-ligninolíticas (Sutherland y col, 1991).

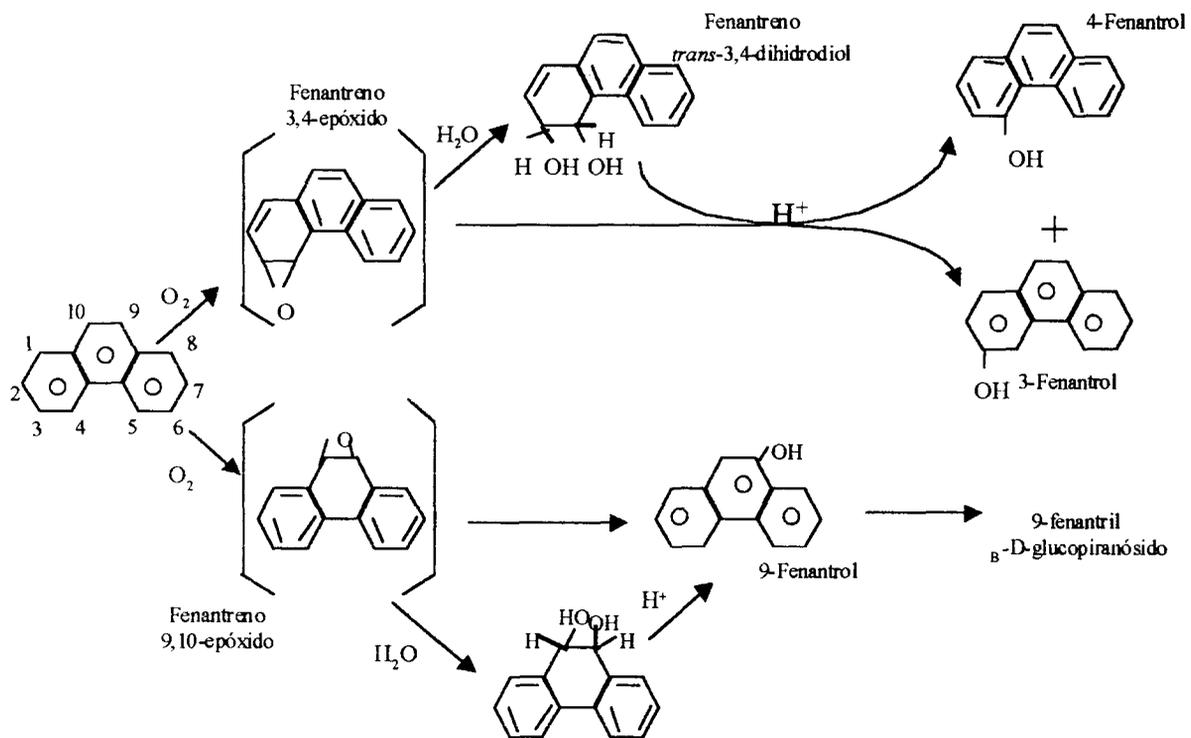


Figura 2.6. Ruta metabólica para la biotransformación de fenantreno por *P. chrysosporium*.

Este esquema fue propuesto en base a la identificación de los intermediarios en medio de cultivo. Aparentemente al inicio actúa el citocromo P-450, el cual da origen a la formación del epóxido inestable en el medio acuoso quien rápidamente sufre un

arreglo no enzimático a los alcoholes correspondientes. Estos alcoholes son menos tóxicos o pueden ser sustituidos por una molécula de glucosa, formándose el 9-fenantril β -D-glucopiranosido que también es menos tóxico. No se encontró formación de CO₂ o H₂O.

Este esquema podría estar incompleto ya que algunos otros autores si reportan mineralización del fenantreno. Sin embargo, hasta el momento es la ruta más completa reportada en la literatura.

2.5.2. BIOTRANSFORMACIÓN COMETABÓLICA DE FENANTRENO.

El cometabolismo ha sido definido como una transformación biológica de un compuesto incapaz de permitir por si mismo la replicación celular en presencia obligada de un sustrato de crecimiento u otro compuesto transformable, esto involucra reacciones de oxidación, dehalogenación, etc. (Dalton y Stirling, 1982).

Se ha postulado que los hongos no emplean PAHs como única fuente de carbono y energía, los cultivos deben ser suplementados con una fuente de carbono adicional lo cual implica que el proceso de biotransformación es cometabólico (Cerniglia, 1997).

Recientemente se ha demostrado que la bacteria *Mycobacterium* S1, aislada de un suelo contaminado y capaz de emplear nueve diferentes PAHs distintos como fuente de carbono, cometaboliza fenantreno, dando lugar a la acumulación de fenantreno trans-9,10-dihidrodiol, cuando se le cultivó en presencia de antraceno como fuente de carbono y energía. Aparentemente enzimas dioxygenasas presentes en el microorganismo atacan al antraceno y lo usan como fuente de carbono y energía, mientras que el citocromo P450 ataca al fenantreno (Tongpim y Pickard, 1999).

El dihidrodiol que se acumula también ha sido identificado en hongos, cianobacterias y actinomicetos. Es posible que este mecanismo sea general a varias especies diferentes de microorganismo, lo cual podría traducirse en que este proceso cometabólico es la vía más frecuente de metabolizar al fenantreno.

Reportes acerca de la biotransformación del fenantreno por *Phanerochaete chrysosporium* (Sutherland y col, 1991) y *Aspergillus niger* (Sack y col, 1997), utilizan otras fuentes de carbono adicionadas en el medio de cultivo como la glucosa y la maltosa, esto se debe a que ninguno de los dos microorganismos puede usar al fenantreno como única fuente de carbono y energía; el proceso es cometabólico.

2.6. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO (FMS).

La FMS se refiere al tratamiento de un material húmedo, no suspendido en el agua y sin escurrimiento, que permite el desarrollo de un cultivo empleando uno o varios microorganismos que transforman los sustratos presentes. La FMS se distingue de los cultivos sumergidos en que el crecimiento microbiano y la formación de producto ocurren sobre la superficie de un material sólido poroso (Mudgett, 1986).

En los sustratos sólidos porosos se observa una mezcla gas-líquido-sólido en la cual la fase acuosa está íntimamente asociada a la superficie sólida en varios estados de sorción y se encuentra en contacto con una fase gaseosa continua con el gas externo del ambiente (Mudgett, 1986); estos sistemas son semejantes a los suelos contaminados, donde la cantidad de agua libre en el sistema es limitada.

Trabajos recientes han sugerido que la FMS podría vencer la represión catabólica y la inhibición por producto final y se inducen cambios en las características de las enzimas que se sintetizan (Shankaranand y col, 1992), en este sentido, esto podría explicar el hecho de que bajo estas condiciones los microorganismos soportan elevadas concentraciones de contaminantes.

La fermentación en medio sólido ha sido usada en estudios fisiológicos y en la producción de algunos metabolitos, por ejemplo, ácido cítrico usando como soporte materiales naturales como bagazo de caña (Lakshminarayana y col, 1975) y puré de manzana (Hang y Woodams, 1987). Debido a su compleja composición (contenido de sales, azúcares, etc.) los soportes de este tipo son desventajosos pues influyen el crecimiento microbiano complicando los estudios básicos de FMS.

En años recientes se ha propuesto el uso de materiales inertes capaces de retener agua y nutrientes como modelos más simples de estudio.

2.7. UTILIZACIÓN Y USO DE SOPORTES SÓLIDOS MODELO.

La utilización de soportes constituye un punto importante para lograr resultados satisfactorios en una FMS, en general las partículas pequeñas proveen una gran área superficial para la transferencia de calor y el intercambio gaseoso.

En general los soporte sobre los cuales se desarrollan los microorganismos de interés deben reunir las siguientes características:

1. Ser inertes.
2. Ser porosos y con espacios libres disponibles.
3. Presentar resistencia mecánica para poder empacarse.
4. Capacidad de retención de agua y nutrientes solubles.

En algunos casos se han usado soportes que además aportan nutrientes para el desarrollo de los microorganismos, algunos ejemplos son: cáscara de naranja (Aravantinos-Zafiriris y col, 1994), desechos de piña (Tran y Mitchel, 1994), bagazo de yuca (Soccol, 1996). En otras ocasiones se han buscado "soportes modelo" en cuanto a forma y tamaño que permitan el uso de medios de cultivo bien definidos, algunos ejemplos son la amberlita (Auria y col, 1990) y la espuma de poliuretano (Zhu y col, 1994).

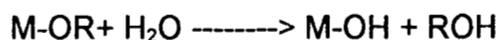
En tanto que la corteza terrestre está constituida en un 75% de SiO_2 , y que las rocas ácidas contienen de 65 a 75% de silicio, una matriz porosa constituida por SiO_2 puede ser una interesante opción para simular un suelo, su matriz microporosa permite la retención del agua y el flujo de nutrientes. Debido a su naturaleza inocua (Pope y col, 1997), se puede pensar que no interfiere con el metabolismo microbiano.

Un candidato interesante como soporte modelo para realizar estudios que simplifique a los suelos, es la sílice.

2.8. TECNOLOGÍA SOL-GEL.

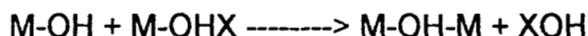
El uso de sílice como modelo de estudio de un suelo ha sido explorado en algunos estudios de adsorción y desorción de contaminantes (Nam y Alexander, 1998; Selig y col, 1999). Estos sistemas son una opción interesante en la búsqueda de nuevos soportes para el crecimiento de microorganismos.

Una propuesta que aún no ha sido explorada es el empleo de la técnica "sol-gel". La química sol-gel se basa en reacciones inorgánicas de polimerización; el proceso inicia con la hidroxilación de alcóxidos metálicos (M-OR, donde M es un metal y R es un sustituyente alquílico) a través de la hidrólisis de grupos alcoxi como sigue:

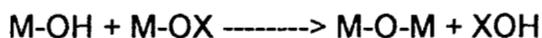


Tan pronto como se generan los grupos hidroxilo, ocurre la propagación a través del proceso de policondensación. Dependiendo de las condiciones experimentales ocurren dos cosas:

- 1) La formación de puentes hidroxilo mediante la eliminación de moléculas de solvente vía oxilación:



- 2) La formación de puentes de oxígeno a través de la eliminación de agua o alcohol vía oxolación:



Estas tres reacciones (hidrólisis, oxolación, olación) están involucradas en la transformación de alcóxidos metálicos precursores, en redes poliméricas de óxidos metálicos.

La hidrólisis y condensación de alcóxidos de silicio $[\text{Si}(\text{OR})_4]$ se ha estudiado mucho; debido a las suaves condiciones de polimerización, el método ha sido usado exitosamente desde 1990 en diferentes sistemas biológicos como encapsulación de proteínas (Braun y col, 1992; Ellerby, 1992), encapsulación de células vivas (Livage y col, 1994; Pope, 1995; Campostrini y col, 1996) e inmunoensayos (Livage, 1996).

En cuanto a la encapsulación de proteínas, se ha trabajado con enzimas observándose las siguientes ventajas:

- 1) Las enzimas se atrapan físicamente, no hay enlaces covalentes lo cual evita que se modifique su estructura y se previene la desnaturalización.
- 2) El tamaño de poros puede ser controlado modificando las condiciones de polimerización.
- 3) Las matrices sol-gel son estables al calor y a la fotodegradación. Esto da estabilidad a las enzimas encapsuladas.
- 4) Los materiales sol-gel pueden tomar una gran variedad de formas como vidrios transparentes, microesferas, etc; lo cual da versatilidad al producto obtenido.

La encapsulación de células vivas ha sido poco explorada; sin embargo, se han reportado usos interesantes como la encapsulación de células de *Pseudomonas* capaces de biodegradar herbicidas (Campostrini y col, 1996).

En términos generales, se ha visto que las principales características para aplicaciones biológicas son:

- i) Preserva la bioactividad de estructuras orgánicas lábiles dentro de su matriz porosa.

- ii) Permite la libre difusión del sustrato a la enzima o de nutrientes o de los nutrientes a las células encapsuladas.
- iii) Permite la eliminación de los productos de desecho a través de su fina estructura porosa.

Un campo que aún no ha sido explorado es el uso de estos materiales como soporte para el crecimiento de microorganismos. En este trabajo se propone la utilización de la tecnología sol-gel para producir un soporte sólido con fenantreno, que permita la colonización por hongos filamentosos (Peralta-Pérez y col, 2001), y eventualmente biotransformen fenantreno.

Justificación

3. JUSTIFICACIÓN.

La biodegradación de cualquier compuesto recalcitrante presente en suelos contaminados resulta difícil de estudiar debido a la gran cantidad de variables involucradas en el proceso y a los graves problemas de transferencia de masa e interacciones que ahí se presentan (Luthy y col, 1997).

Como los ambientes naturales son complejos y con muchas interferencias, el uso de soportes modelo constituye una útil herramienta encaminada al estudio y comprensión de estos fenómenos (Cornelissen y col, 1998). Dado que los suelos están constituidos de 75% de óxidos de silicio (Cepeda, 1991), una buena aproximación a la naturaleza del suelo es la sílice; existen algunos estudios con sílice que se han limitado a estudiar los fenómenos de sorción y desorción de moléculas contaminantes (Nam y Alexander, 1998), dichos estudios no incluyen a los microorganismos y su interacción con los compuestos contaminantes.

Los conocimientos referidos a las Fermentaciones en Medio Sólido (FMS) pueden ayudar a estudiar los procesos que ocurren en forma natural en estos sitios. El proceso de polimerización de SiO_2 junto con moléculas modelo de contaminante, empleando la metodología sol-gel es una alternativa para producir soportes que permitan el crecimiento microbiano y la biodegradación de moléculas contaminantes, con la enorme ventaja de que se tiene dominio sobre el proceso de polimerización pudiéndose controlar el tamaño de poros y la cantidad de contaminante atrapado en la red polimérica. Esta idea aún no ha sido explorada, así que inicialmente deberá comprobarse que los microorganismos de interés tengan las condiciones adecuadas para su desarrollo y eventual capacidad de biotransformación de contaminante.

Dado que estos geles pueden ser preparados en presencia de alguna otra molécula para que quede atrapada dentro de la red polimérica (Livage, 1996); una propuesta interesante es emplear fenantreno ya que es una molécula muy abundante tanto en suelos intemperizados como contaminados recientemente además, su manejo y cuantificación son más fáciles en comparación con otros PAHs.

Los geles de SiO₂ se convierten en xerogeles quebradizos y sumamente porosos después de perder humedad, este sistema podría ser capaz de adsorber agua y nutrientes que permitan el desarrollo de microorganismos, resultando un buen modelo para estudiar los mecanismos de la biodegradación de fenantreno en suelos donde predomina la fracción mineral.

Los hongos son microorganismos muy interesantes debido a que crecen predominantemente en suelos ácidos y con poca cantidad de agua; además, especies como el hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* (Bumpus, 1989; Barr y Aust, 1994; Reddy, 1995) y el no ligninolítico como *Aspergillus niger* (Kamath y Vaidynathan, 1990; Sack y col, 1997) son capaces de degradar fenantreno y se conoce mejor su metabolismo de degradación.

Debido a que el metabolismo de degradación de los hongos ha sido estudiado preferentemente en sistemas líquidos, es importante realizar este tipo de estudios a fin de comparar sus resultados con los obtenidos en sistemas sólidos.

El empleo de estos sistemas experimentales modelo podría generar información útil acerca del comportamiento de los hongos en este tipo de sistemas sugiriendo respuestas a los fenómenos observados en la naturaleza.

Objetivos

4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener un xerogel de óxido de silicio cuyas características permitan su uso como soporte sólido modelo para el crecimiento de hongos filamentosos degradadores de fenantreno.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar un xerogel de SiO_2 polimerizado en presencia de fenantreno como impureza, capaz de retener agua y nutrientes.
- Evaluar el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* A594 y *Aspergillus niger* ATCC9642 sobre el xerogel obtenido.
- Cuantificar la biotransformación de fenantreno en el xerogel de SiO_2 .
- Evaluar la biotransformación y la sorción de fenantreno por los dos hongos filamentosos cultivados en medio líquido.

Materialles y Métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados durante este estudio fueron adquiridos en J.T. Baker, a excepción del fenantreno (Sigma) y el tetraetoxisilano (Aldrich).

Para la preparación de los medios de cultivo se usó medio papa-dextrosa-agar, extracto de levadura y extracto de malta de Bioxon.

La molécula modelo de PAHs fue el fenantreno (C₁₄H₁₀). El fenantreno es un sólido de cristales brillantes e incoloros cuyas principales características fisicoquímicas se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Propiedades fisicoquímicas del fenantreno.

Solubilidad en agua (25°C)	1.29 mg/l
Peso específico	1.063
Punto de fusión	100.35 °C
Punto de ebullición	340
Coefficiente de partición (octanol/H ₂ O)	4.46
Límite máximo permitido en efluentes por la FDA	0.028 mg/l

5.2. MICROORGANISMOS Y CONSERVACIÓN DE CEPAS.

Se trabajó con dos cepas de hongos filamentosos: el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* A594 (Universidad de Alcalá de Henares, España) y el deuteromiceto *Aspergillus niger* ATCC9642. Se sabe que ambos hongos son biotransformadores de compuestos xenobióticos.

Las esporas de ambas cepas se conservaban en viales con glicerol (30%). Las esporas se propagaron en tubos con medio papa-dextrosa-agar (PDA) para después almacenarse en refrigeración a 4°C. Las esporas de los tubos se propagaron por estría cruzada en placas de PDA y se incubaron a 35°C por 24 h, después de este tiempo se observó la formación de colonias bien definidas de las cuales se eligió

una para ser nuevamente propagada en placas de PDA por estría cruzada. Esta operación de resiembra se realizó tres veces con la finalidad de asegurar cultivos axénicos de cada microorganismo; finalmente, de la colonia seleccionada las esporas se propagaron en tubos inclinados incubándolos durante cinco días a 35°C, estos tubos de conservación se mantuvieron en refrigeración y se usaron normalmente para producir el inóculo necesario para cada experimento.

5.3. COSECHA Y CONTEO DE ESPORAS.

Las esporas de los tubos de conservación se cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01%; 250 μ l de cada cepa se sembraron en matraces Erlenmayer con 50 ml de PDA. Se incubaron durante cinco días a 35°C, al final de los cuales se observó una esporulación muy abundante.

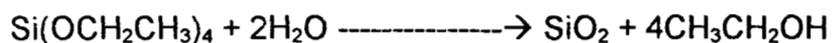
Las esporas de *P. chrysosporium* A594 producidas en cinco matraces Erlenmayer se cosecharon usando 50 ml de Tween 80 al 0.01%, mientras que en el caso de *A. niger* ATCC9642 se cosecharon las esporas producidas en tres matraces Erlenmayer con 50 ml de PDA.

Las esporas cosechadas se diluyeron con agua destilada, en relación 1:10 para el caso de *P. chrysosporium* A594 y 1:20 en el caso de *A. niger*. Las esporas se observaron en un microscopio Zeiss con el objetivo de 40X, y se contaron 13 cuadros al azar. El promedio de las esporas por cuadro se transformó a concentración de esporas (esporas/ml), considerando que 25 cuadros contienen 1×10^{-4} ml. De esta forma se obtuvieron conteos de 1×10^6 esporas/ml para ambos microorganismos.

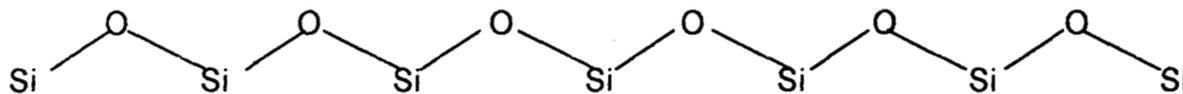
Las esporas se usaron para inocular los experimentos tanto de los cultivos sólidos como líquidos.

5.4. SÍNTESIS DEL XEROGEL DE SiO₂.

Para la obtención del xerogel de SiO₂ se empleó tetraetoxisilano (TEOS) y H₂O de acuerdo a la siguiente reacción global:



Una vez que inicia el proceso ocurre la transformación del tetraetoxisilano en redes poliméricas de SiO₂, como las que se muestran a continuación:



Dichas redes poliméricas dan como resultado la formación de estructuras porosas que dependerán de las condiciones a las cuales se llevó a cabo la polimerización.

De la ecuación se observa que por cada mol de TEOS reaccionan dos moles de agua, por esta razón el agua debe estar en exceso. De este modo se eligieron las relaciones molares de [TEOS:H₂O] de [1:2], [1:6] y [1:10].

Además se sabe que dependiendo del pH del medio de reacción se afectará la estructura cristalina del sólido que se obtenga (Brinker y Scherer, 1990), se eligieron diferentes pH's del medio de reacción (3, 4.5 y 10).

De este modo se prepararon varios xerogeles empleando diferentes relaciones molares de tetraetoxisilano (TEOS) y agua, así como pH inicial de acuerdo a la tabla 5.2.:

Tabla 5.2. Relaciones molares empleadas para la polimerización del xerogel.

Experimento	[TEOS/H ₂ O]*	pH
1	[1/2]	3
2	[1/2]	4.5
3	[1/2]	10
4	[1/6]	3
5	[1/6]	4.5
6	[1/6]	10
7	[1/10]	3
8	[1/10]	4.5
9	[1/10]	10

*Además, se prepararon otros xerogeles adicionando 250 μ l de una solución de fenantreno (1000 ppm). Así se obtuvieron xerogeles con y sin fenantreno como impureza.

La polimerización se llevó a cabo empleando cajas de petri calculándose producciones de xerogel de tres gramos por cada caja de petri. El procedimiento fue el siguiente:

- I. Se colocaron en un vaso de precipitados 6.12 ml de agua destilada, se agitó suavemente con ayuda de un agitador magnético.
- II. Se adicionaron 22.32 ml de tetraetoxisilano lentamente. Se agitó la mezcla durante 10 min.
- III. Se adicionó HCl 0.1N ó NaOH 0.1N, según fue el caso hasta alcanzar el pH deseado.
- IV. Para las muestras con fenantreno, se les adicionó 750 μ l de una solución 3000 ppm de fenantreno en dimetilformamida.

Una vez preparados, se colocaron en una estufa a 60°C durante 24 h, con la finalidad de acelerar la reacción y favorecer el proceso de envejecimiento. Al final del proceso se obtuvo un bloque de xerogel color blanco.

Con la finalidad de eliminar todo el etanol que pudiera ser tóxico para los microorganismos que posteriormente serían cultivados empleando este soporte, los bloques obtenidos de xerogel se colocaron en recipientes con agua en relación 1:10 a 60°C durante 24 h. Pasado ese tiempo se secaron a 50°C por 24 h.

Los xerogeles así obtenidos se maceraron con ayuda de un mortero a fin de obtener fragmentos que pudieran tamizarse. Se conservó la fracción de xerogel entre malla 8 y 30, dicha fracción fue la que se empleó para realizar los análisis correspondientes y los cultivos sólidos.

5.5. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL XEROGEL.

Para caracterizar fisicoquímicamente a los xerogeles elaborados, se realizaron las siguientes pruebas por triplicado:

I. Capacidad de retención de agua. Se pesó aproximadamente un gramo del xerogel, y se colocó en un papel filtro (puesto previamente a peso constante). El xerogel con el papel se colocó en un embudo y se agregaron 10 ml de agua a fin de humedecer todo el material, posteriormente se añadieron 10 ml más de agua. Se esperó a que dejara de escurrir (aproximadamente 15 min) y se pesó el material humedecido. Finalmente se calcularon los gramos de agua que se retuvieron.

II. Porosidad y área superficial. Para los análisis de área superficial y tamaño promedio de poros se empleó la técnica de adsorción de N₂, con un equipo ASAP-2000 y a 77°K (Apéndice III). Para calcular el área superficial se usó el método BET (Brunauer, Emmett y Teller) y para el cálculo de distribución de tamaño de poros se empleó el método el método BJH (Barret, Joyner y Halender).

III. Rendimiento del gel. Se colocaron a peso constante las cajas petri donde se llevó a cabo la polimerización; una vez preparados los geles, se colocaron en las cajas previamente pesadas; al final de la reacción se volvieron a pesar.

5.6. CULTIVO SÓLIDO

Se realizaron dos tipos de ensayo empleando los xerogeles sin fenantreno y con fenantreno.

En ambos casos se emplearon botellas serológicas de 160 ml con 7.2 g base seca del xerogel y se adicionaron 6 ml del medio de cultivo reportado por Sutherland y col (1991) concentrado dos veces de acuerdo a la tabla 5.3.:

Tabla 5.3. Composición del medio de cultivo utilizado para los cultivos sólidos.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN [g/l]
Extracto de malta	40
Glucosa	40
Extracto de levadura	3.6
Tween 80	100 mg
Maltosa	4.8

El pH se ajustó a 5.5. Las botellas se taparon empleando tapones de hule y se esterilizaron (15 min a 15 lb/pg²).

Las botellas estériles de los cultivos sin fenantreno se inocularon con la solución de esporas de los diferentes hongos en la campana de flujo laminar (17X10⁶ esp/g soporte). Las botellas se incubaron a 35°C y cada 24 ó 48 horas se retiraban tres botellas de cada microorganismo para realizar los análisis correspondientes.

Para los cultivos de xerogel con fenantreno se procedió de la misma forma, pero después de la esterilización se añadió 1 ml de solución de fenantreno en hexano (2.4 mg/ml) y después se dejó evaporar durante 8 h en la campana de flujo laminar.

De esta forma se obtuvieron muestras de xerogel con fenantreno íntimamente asociado a la matriz del xerogel y otra parte más biodisponible para los microorganismos en forma análoga a lo que ocurre en un suelo contaminado.

Los xerogeles tuvieron una concentración inicial de fenantreno de 250 mg de fenantreno/kg de xerogel base seca (ppm). Estas botellas con xerogel se inocularon con 17×10^6 esp/g soporte de cada uno de los hongos, se incubaron a 35°C y cada 24 ó 48 horas se retiraban tres botellas de cada microorganismo para realizar los análisis correspondientes.

225705

5.7. CULTIVO LÍQUIDO

5.7.1. Medio de Cultivo.

Se empleó el medio de cultivo reportado por Sutherland y col (1991) que se describe en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Composición del medio de cultivo utilizado para los cultivos líquidos.

Compuesto	Concentración g/l
Extracto de malta	20
Glucosa	20
Extracto de levadura	1.8
Bacto- maltosa	2.4
Tween 80	50 mg

Se ajustó el pH a 5.5. Se prepararon matraces Erlenmayer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo, rutinariamente los matraces fueron tapados empleando un tapón de hule cubierto con papel aluminio a fin de evitar pérdidas de fenantreno (Apéndice II).

Por otro lado, se prepararon soluciones de 0, 6, 10 y 20 mg/ml de fenantreno en dimetilformamida a fin de añadir 125 μ l de cada solución a los matraces y ajustar al final concentraciones de 0, 15, 25 y 50 ppm de fenantreno, según se requirieran.

Cada matraz fue inoculado con 1×10^5 esp/ml de *Phanerochaete chrysosporium* A594 o *Aspergillus niger* ATCC9642, y se incubaron a 35°C y 125 rpm.

5.7.2. Estudio de sorción y biotransformación de fenantreno.

Los microorganismos se propagaron en medio líquido, sin adicionar fenantreno al cultivo; después de tres días la biomasa se filtró y lavó con 50 ml de solución fisiológica estéril en la campana de flujo laminar, la mitad de la biomasa producida en los matraces se esterilizó (15 min a 15 lb/pg²). Los nuevos matraces con 50 ml de medio de cultivo fresco fueron sembrados con biomasa estéril o con biomasa precultivada. Se adicionó 125 µl de solución de fenantreno en dimetilformamida con concentración de 10 mg/ml (25 ppm de fenantreno en el medio). Los matraces se cerraron empleando un tapón de hule cubierto con papel aluminio y se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones.

5.7.3. Cinética de crecimiento y biotransformación de fenantreno en medio líquido.

El medio de cultivo fue repartido en 28 matraces Erlenmayer de 250 ml, cada matraz con 50 ml de medio de cultivo. A cada uno se le adicionaron 125 µl de una solución de fenantreno en dimetilformamida con una concentración de 10 mg/ml, para ajustar al final una concentración de 25 mg de fenantreno/l de medio de cultivo. Cada matraz se inoculó con 1×10^5 esp/ml de cada microorganismo y se incubaron a 35°C y 125 rpm. Cada 24 horas se retiraron cuatro matraces para realizar los análisis correspondientes.

5.8. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS.

Los análisis fisicoquímicos que se realizaron en los diferentes cultivos fueron los siguientes:

5.8.1. pH. En los cultivos líquidos el pH se midió directamente empleando un potenciómetro Conductronic pH130. Para las muestras del cultivo sólido se pesó un gramo del xerogel con el hongo (previamente homogeneizado, mediante agitación del contenido total de la botella serológica) y se le adicionaron 10 ml de agua destilada; se agitó suavemente con ayuda de un agitador magnético durante 10 min y se tomó la lectura de pH en el sobrenadante. El sobrenadante fue usado posteriormente para la determinación de azúcares reductores.

5.8.2. Azúcares reductores. Se determinaron mediante la técnica modificada del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

El reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) se preparó de la siguiente forma:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN [g/l]
Acido 3,4 dinitrosalicílico	10
NaOH	10
Sulfito de sodio anhidro	0.5
Fenol	2

Inicialmente se disolvió el NaOH y después el resto de los componentes. El reactivo así preparado se guardó en un frasco color ámbar a temperatura ambiente.

En tubos de ensaye se colocaron por duplicado 100 µl de cada muestra y 100 µl de reactivo DNS, se pusieron en un baño a ebullición durante cinco minutos, se enfriaron con hielo y se adicionaron 800 µl más de agua. Finalmente se leyó la absorbancia a 575 nm.

Para calcular las concentraciones de azúcares reductores en las muestras, la absorbancia de éstas se extrapoló a una curva patrón de glucosa elaborada en un rango de 0 a 1 g/l que siempre se preparó con cada lote de muestras problemas.

5.8.3. Cuantificación de biomasa en cultivo líquido. La biomasa producida en tres matraces de los cultivos líquidos se filtró empleando papel Whatman No. 41, previamente puesto a peso constante y pesado, se lavó abundantemente con agua

destilada. Se dejó 24 h en una estufa a 60°C y se volvió a pesar el papel más la biomasa, la diferencia se consideró como el peso de la biomasa producida.

5.8.4. Humedad. La humedad de las muestras de xerogel se calculó pesando 1.5 g de xerogel y dejándolo secar en la estufa a 60°C, la pérdida de peso se consideró como el contenido de humedad.

5.8.5. Extracción de fenantreno. El fenantreno de los cultivos líquidos se extrajo empleando acetato de etilo (1:5, v/v), el procedimiento fue el siguiente:

Para muestras sólidas: las muestras de los cultivos sólidos fueron homogeneizadas con ayuda de una espátula, se pesó por triplicado un gramo del material homogeneizado para cada muestra y se colocó en tubos de ensayo, se adicionaron 10 ml de acetato de etilo, se agitó vigorosamente durante tres minutos y se empleó el sobrenadante para la cuantificación.

Para muestras líquidas: de cada matraz se tomó por triplicado un ml de medio de cultivo y se colocó en tubos de ensayo con tapón de rosca, a cada tubo se le adicionaron 5 ml de acetato de etilo, se agitó vigorosamente durante tres minutos y se usó la fase orgánica para la cuantificación.

Para biomasa: la biomasa producida en cada matraz se filtró y lavó abundantemente con solución fisiológica, se transfirió a tubos de ensayo y se adicionaron 20 ml de acetato de etilo, se agitó vigorosamente durante tres minutos, se dejó en oscuridad 8 h y se volvió a agitar vigorosamente. El acetato de etilo se empleó para la cuantificación.

Las muestras extraídas se filtraron con ayuda de una jeringa de vidrio a través de una membrana de teflón de 0.45 µm. Las muestras filtradas se colocaron en viales de 2 ml para su posterior análisis en el HPLC.

5.8.6. Detección de fenantreno por ultravioleta.

Cuando se requirió identificar en forma rápida al fenantreno y no existían interferencias por otros compuestos, como fue el caso de la determinación de las pérdidas de fenantreno por factores abióticos se realizó un barrido desde 200 hasta 400 nm empleando un espectrofotómetro Shimadzu, UV-160A. El fenantreno mostró un espectro con un pico de máxima absorbancia a 254 nm (Sutherland y col, 1991). En este caso se elaboró una curva patrón y se observó que el método es lineal hasta las 9 ppm de fenantreno en acetato de etilo.

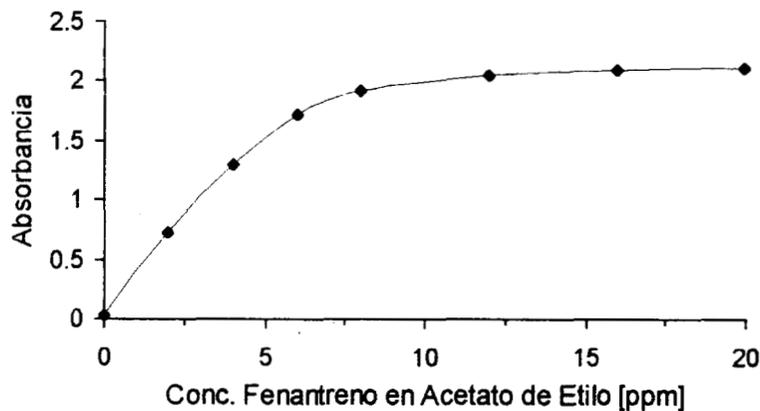


Figura 5.1. Curva patrón típica de fenantreno en acetato de etilo. Cuantificado por su absorbancia a 254 nm en UV.

Para el caso de las muestras de xerogel con fenantreno, la identificación del fenantreno se realizó por reflectancia difusa empleando un espectrofotómetro UV para sólidos (Varian, Cary E-5). Las muestras de xerogel copolimerizado con fenantreno se molieron finamente con ayuda de un mortero de ágata, se pesó aproximadamente 0.02 g de muestra que se esparció en un portamuestras para sólidos procurando que la compactación fuera igual a lo largo del portamuestras. Se tomó la lectura en el pico de máxima absorción se encontró a los 250 nm, es este punto se tomó la lectura de absorción y se construyó la curva patrón que se muestra en la figura 2.

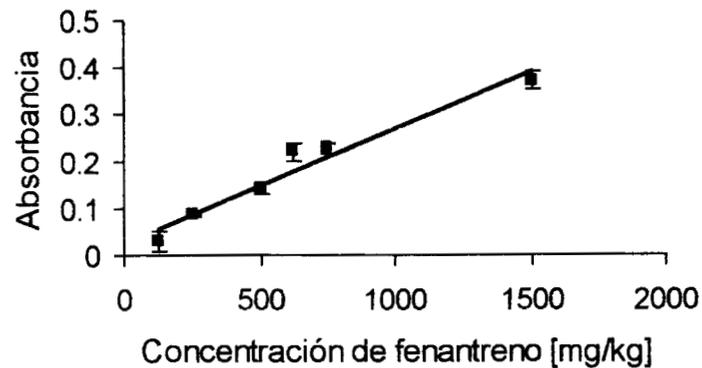


Figura 5.2. Curva patrón típica de fenantreno en la matriz del xerogel. Cuantificado por reflectancia difusa 250 nm en UV.

Este método permite conocer la cantidad de fenantreno real dentro de la matriz, sin embargo sólo se detectan concentraciones superiores a las 50 ppm en la matriz de xerogel.

5.8.7. Cuantificación de Fenantreno por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

Tanto en los cultivos sólidos como líquidos de *P. chrysosporium* A594 y *A. niger* ATCC9642 se presentaron interferencias en el espectro UV característico del fenantreno debido a la producción de metabolitos con absorción a longitudes de onda similares a las del fenantreno.

Por esta razón, el fenantreno residual en los cultivos líquidos y sólidos se cuantificó empleando HPLC, con un equipo SP Thermo Separation Products (Automatizador 545 y Bomba ConstaMetric 3200).

Las condiciones fueron las siguientes:

Columna: ODS 18

Fase Móvil: Acetonitrilo-Agua (60-40; v/v)

Temperatura de la columna: 40°C

Velocidad de Flujo: 1.5 ml/min

Detector EspectroMonitor 4100: Ultravioleta, a 254 nm.

El fenantreno tuvo un tiempo de retención de 5.5 min (Apéndice I).

5.8.8. Balances de Fenantreno.

La biotransformación del fenantreno para los cultivos líquidos se calculó con un sencillo balance de materia, en base la siguiente la fórmula:

$$FE_{\text{entrada}} = FE_{\text{sobrenadante}} + FE_{\text{biomasa}} + FE_{\text{biotransformado}}$$

Donde:

FE_{entrada} Es el fenantreno remanente en los blancos sin inóculo.

FE_{sobrenadante} Es el fenantreno remanente en el sobrenadante de los matraces inoculados.

FE_{biomasa} Es el fenantreno sorbido en la biomasa.

FE_{biotransformado} Es el fenantreno biotransformado que se puede calcular por diferencia despejándolo de la fórmula propuesta.

Empleando este balance de materia pudo ser posible calcular el fenantreno biotransformado por las cepas de hongos.

5.8.9. Tratamiento para la observación de muestras al microscopio electrónico.

Para las observaciones al microscopio electrónico de las muestras colonizadas por los microorganismos sobre el xerogel se realizó el siguiente procedimiento:

1. Las muestras frescas se colocaron durante 24 h en viales de 1 ml con una solución de glutaraldehído al 6% con la finalidad de estabilizar la actividad

enzimática, en buffer de fosfatos 0.02M y pH 7.2. Las muestras se lavaron varias veces con buffer de fosfatos 0.02M y pH 7.2 con la finalidad de eliminar todo el glutaraldehído.

2. Las muestras fueron postfijadas con osmio a fin de que el osmio penetrara en los tejidos y protegiera a las muestras del haz de electrones al que serán sometidas. Para ello, una vez eliminado todo el glutaraldehído, a las muestras se les añadió una solución acuosa de osmio (2%). Después de 2 horas, se eliminó el osmio lavando con el mismo buffer de fosfatos.
3. Las muestras fijadas, se deshidrataron empleando alcohol etílico. Para ello se les fue adicionando a las muestras alcohol al 30% dejándolas media hora y repitiendo la operación después. Se continuó con alcohol al 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y finalmente al 100%.
4. Las muestras deshidratadas se colocaron en cápsulas microporosas (Electron Microscopy Science) y se desecaron al punto crítico sustituyendo el alcohol por CO₂ en un equipo Tousimis, Mod. Samdri-780B (las condiciones fueron temperatura de 36.1°C y presión de 1070 lb/pg²).
5. Las muestras se montaron en los portaobjetos usando cinta de carbón. Se recubrieron con oro (tres descargas de 40 mA/50 s cada una, bajo una atmósfera de argón) en un metalizador de alto vacío (Bal-Tec SCD 050).
6. Finalmente, las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (JSM-500 LV), usando electrones secundarios, con un voltaje de aceleración de 5 kV y una distancia promedio de trabajo entre 11 y 13 mm.

Resultados y Discusión

6. CARACTERIZACIÓN DEL XEROGEL DE SiO_2 COMO SOPORTE PARA EL CULTIVO SÓLIDO.

Los suelos tienen una importante fracción mineral, uno de los compuestos más abundantes dentro de dicha fracción mineral es la sílice (75%).

En esta primera etapa se ensayaron varias condiciones para obtener xerogeles de SiO_2 porosos, a fin de que pudieran adsorber nutrientes y permitir el desarrollo de los hongos.

6.1. CONDICIONES DE OBTENCIÓN DEL XEROGEL DE SiO_2 .

La etapa inicial del estudio consistió en determinar las mejores condiciones para la obtención de un xerogel con características que favorecieran el desarrollo de los microorganismos seleccionados.

Se decidió preparar varios xerogeles empleando diferentes relaciones molares de tetraetoxisilano (TEOS) y agua, así como distintos pH's iniciales a fin de evaluar su máxima capacidad de retención de agua, que influye en forma importante en el desarrollo de los microorganismos, así como también el rendimiento en la obtención del xerogel.

Debido a que el agua debe estar en exceso, se trabajó con tres diferentes relaciones molares de [TEOS/ H_2O] que fueron [1/2], [1/6], y [1/10]; así como tres pH extremos: 3, 4.5 y 10 (Sánchez y Livage, 1990).

La figura 6.1. muestra los resultados de la capacidad de retención de agua de los xerogeles, como g de agua retenida/g de xerogel. En términos generales, las relaciones molares más altas (1:10) favorecen la obtención de xerogeles con mayor capacidad de retención de agua (2.5-3.5 g agua/g material) lo cual resulta muy favorable para el desarrollo de los microorganismos.

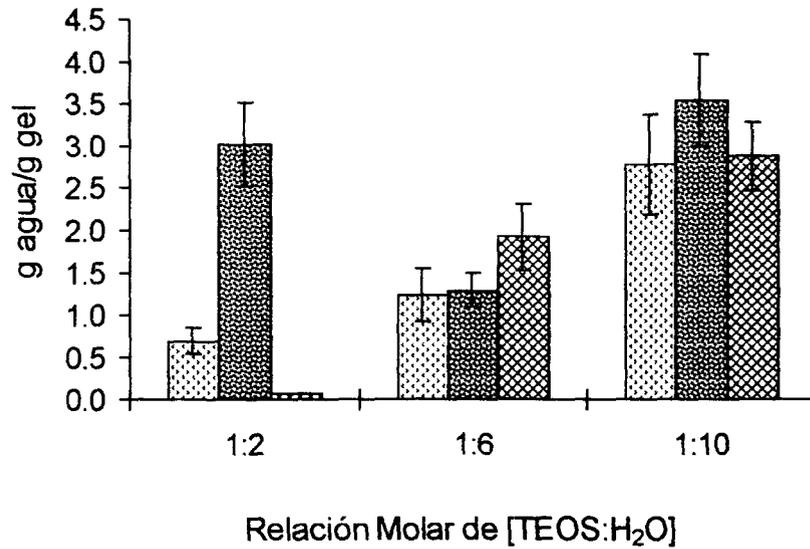


Figura 6.1. Capacidad de retención de agua en los xerogeles preparados con distintas concentraciones molares de TEOS y agua, así como distintos pH's iniciales.

□ pH=3, ▨ pH=4.5, ▩ pH=10

La figura 6.2. muestra los resultados del rendimiento del xerogel en cada una de las diferentes condiciones ensayadas. En casi todos los casos se obtuvieron rendimientos por debajo del 50%, excepto para la relación molar 1/10 y pH=3, donde el rendimiento fue alrededor del 75%. Estos bajos rendimientos pueden atribuirse a una reacción incompleta del TEOS con el agua a consecuencia de la heterogeneidad en el medio de reacción, dicha heterogeneidad se atribuye a la insolubilidad del TEOS con el agua. Sin embargo, la tendencia general es que pH's ácidos favorecen mejores rendimientos.

225705

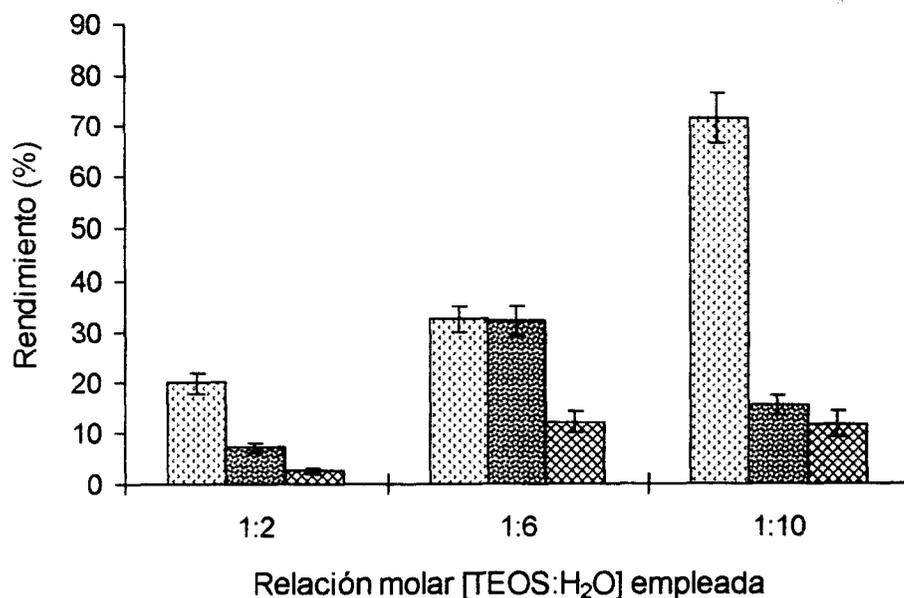


Figura 6.2. Rendimiento del xerogel obtenido a diferentes valores de pH.

□ pH=3, ▨ pH=4.5, ▩ pH=10

A partir de los resultados anteriores, se puede concluir que las mejores condiciones para obtener un xerogel con buenas características para el cultivo de microorganismos son relación molar [1/10] y pH = 3; con lo que se obtiene un rendimiento promedio de $73.3\% \pm 3.3\%$ y una capacidad de retención de agua de 3.5 ± 0.5 g de agua/g material; esta capacidad de retención de agua nos asegura que la matriz polimérica de SiO₂ adsorberá agua y nutrientes indispensables para el desarrollo de los microorganismos. La capacidad de retención de agua es muy elevada comparada con otros soportes modelo inertes, por ejemplo, para la amberlita sólo es de 0.59 g de agua/g amberlita (Auria y col, 1990).

Aunque aparentemente estos parámetros indican que el xerogel podría favorecer el desarrollo de los microorganismos, es importante determinar el tamaño promedio de poros, ya que de esto dependerá si una molécula del tamaño del fenantreno (cuyo diámetro molecular es de 7.94 Å) puede migrar a través del xerogel para llegar hasta los microorganismos.

6.2. POROSIDAD Y ÁREA SUPERFICIAL DEL XEROGEL SIN FENANTRENO.

Se sintetizó un xerogel de acuerdo a las condiciones encontradas en el capítulo anterior sin adicionar la molécula modelo (fenantreno) a fin de comparar los resultados con un suelo limpio.

La figura 6.3. muestra la isoterma de adsorción de gas N_2 para el xerogel sin fenantreno. Se puede observar que es una isoterma Tipo IV (ver Apéndice III), lo cual indica que se trata de un sólido mesoporoso (los mesoporos tienen un tamaño promedio de poros entre 20 y 500 Å, según Gregg y Sing, 1982), el tamaño promedio de los poros de este xerogel fue de 30Å, con un área superficial de $759.36 \pm 8.34 \text{ m}^2/\text{g}$.

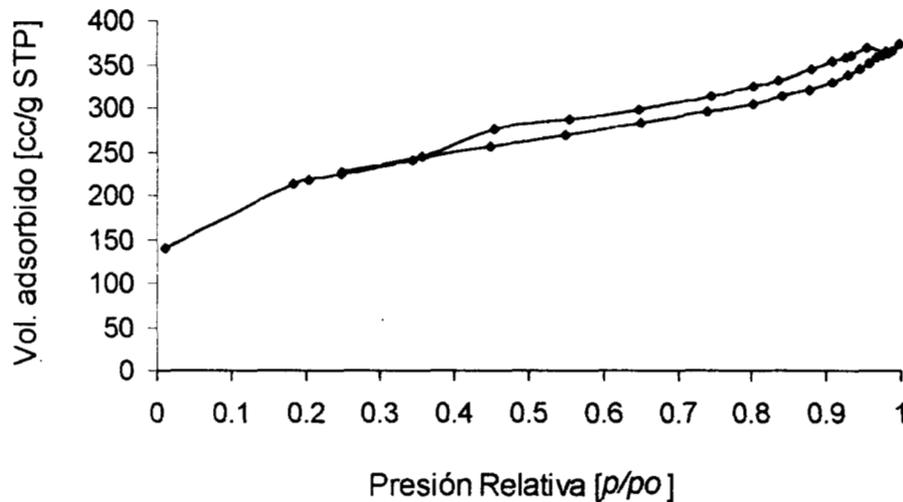


Figura 6.3. Isotherma de adsorción de N_2 para un xerogel sin fenantreno.

El tamaño promedio de poros resulta muy pequeño; sin embargo, se puede pensar que un sistema de este tipo no interferirá con el desarrollo de los microorganismos ya que permitirá el libre paso de las moléculas de nutrientes desde el interior de la matriz polimérica hasta el hongo.

Debido a que el tamaño promedio de las esporas es de aproximadamente $10 \mu\text{m}^*$ (Dhawale y Kessler, 1993) y el ancho de las hifas es de $3 \mu\text{m}^*$ (Larralde-Corona y col, 1997), la colonización del soporte será superficial, aprovechándose las ocasionales fracturas e imperfecciones del mismo (Peralta-Pérez y col, 2001).

* Nota: $1 \mu\text{m} = 10^3 \text{ nm} = 10^4 \text{ \AA}$

Debido al área superficial que presenta este sistema, hay una gran cantidad de microporos como puede observarse en la figura 6.4.

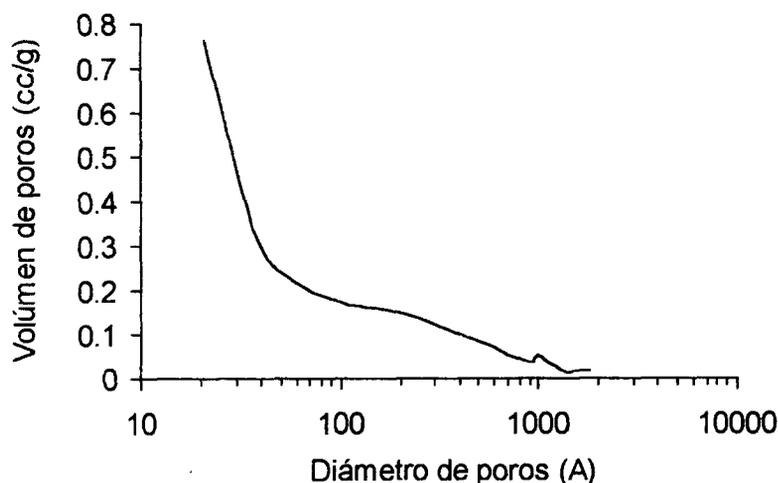


Figura 6.4. Distribución del tamaño de poros en un xerogel sin fenantreno.

En este caso el volumen mayor de poros oscila entre 20 y 50 Å, aunque también hay poros de un tamaño mayor. Este tipo de sistemas pueden permitir el paso de moléculas como el fenantreno (con diámetro promedio de 7.94 Å).

Un sistema más cercano a un suelo contaminado es un xerogel con fenantreno; así que se procedió a realizar el análisis de este sistema.

6.3. POROSIDAD Y ÁREA SUPERFICIAL DEL XEROGEL CON FENANTRENO.

Debido a que un xerogel con fenantreno es un sistema modelo más semejante a un suelo, se procedió a preparar bajo las mismas condiciones un xerogel adicionando una solución de fenantreno en dimetilformamida.

La figura 6.5. muestra la isoterma de adsorción obtenida para el xerogel con fenantreno. Se puede observar que también es una isoterma de tipo IV, es un sólido mesoporoso cuyo tamaño promedio de poros fue de 89.64 Å, y con un área superficial de $436.75 \pm 0.91 \text{ m}^2/\text{g}$. En este caso, el tamaño promedio de poros fue tres veces mayor al obtenido para un xerogel sin fenantreno.

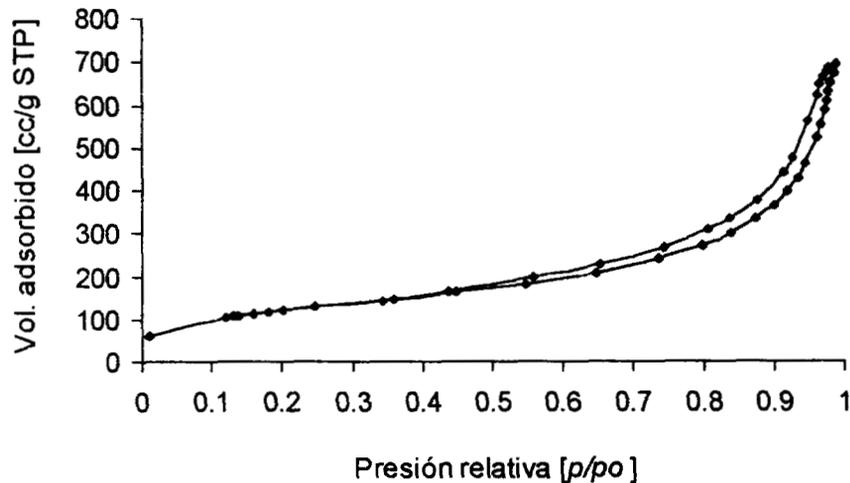


Figura 6.5. Isoterma de adsorción para un xerogel con fenantreno.

La presencia de una molécula contaminante, fenantreno en este caso, modifica la estructura mesoporosa del sistema y su presencia favorecerá la polimerización del TEOS alrededor de las moléculas de fenantreno presentes en el medio de reacción haciendo que la red polimérica sea más abierta.

Esto explicaría que en el xerogel preparado en presencia de fenantreno, el tamaño promedio de poros es mayor comparado con el xerogel preparado sin fenantreno. La distribución del tamaño de poros para el xerogel preparado con fenantreno se muestra en la figura 6.6. Se observa que en este sistema el tamaño de poros oscila entre 200 y 600 Å, los poros son diez veces más grandes comparado con el xerogel preparado sin fenantreno (donde la mayor cantidad de poros tenían un tamaño entre 20 y 50 Å).

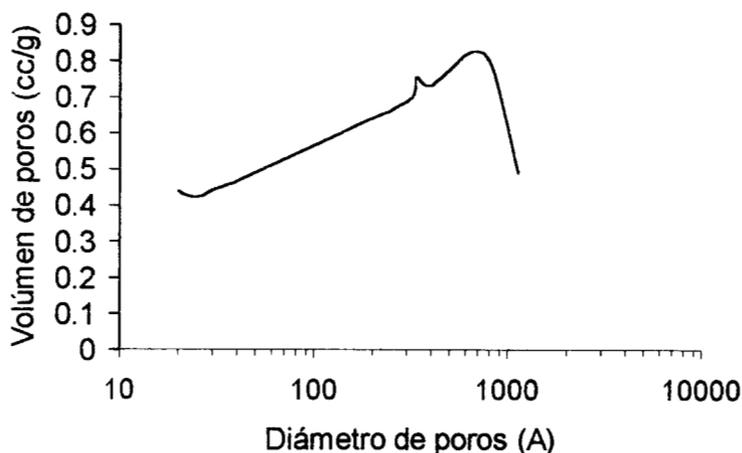


Figura 6.6. Distribución del tamaño de poros en un xerogel con fenantreno.

Se realizaron también isotermas de adsorción tanto para una muestra de suelo limpio, como para suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos. Dicho suelo es de tipo franco-arenoso proveniente de la zona de Veracruz, con contenido de materia orgánica de 3.9% y pH de 3.88.

Las isotermas de adsorción obtenidas de estos suelos permitieron comparar estos sistemas reales con los xerogeles propuestos como modelo de estudio.

Como se aprecia en la figura 6.7., las isotermas de adsorción de los suelos analizados son también de Tipo IV. En este caso el tamaño promedio de poros del suelo limpio fue de 114 Å y el del suelo contaminado fue de 305 Å.

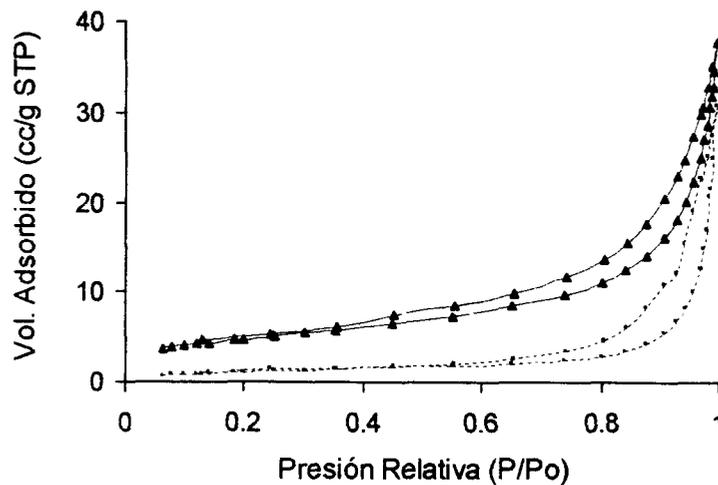


Figura 6.7. Isotherma de adsorción para suelos.

(-▲-) Suelo limpio, (-----) Suelo contaminado

Debido a que tanto los suelos analizados como los xerogeles obtenidos por la polimerización son sistemas mesoporosos con tamaño promedio de poros superior a 90 Å, y a que un suelo de tipo franco-arenoso con bajo contenido de materia orgánica tiene un pH de 3.88 (el xerogel elegido fue preparado con un pH de 3), es posible pensar que puede ser empleado como un modelo de estudio simplificado para la comprensión de los fenómenos que ocurren en suelos contaminados.

La figura 6.8. muestra la distribución del tamaño de poros tanto de un suelo limpio (figura 6.8.A.), como de un suelo contaminado (figura 6.8.B.). Se observa que las curvas se modifican por la presencia de los hidrocarburos, sin embargo, la mayor cantidad de poros tienen un tamaño alrededor de 600 Å. La distribución de poros de estos suelos son similares a los obtenidos en xerogeles con fenantreno, con esto puede suponerse que en términos de distribución de tamaños de poros y porosidad promedio, los xerogeles obtenidos con fenantreno son similares a los suelos de tipo franco-arenoso analizados.

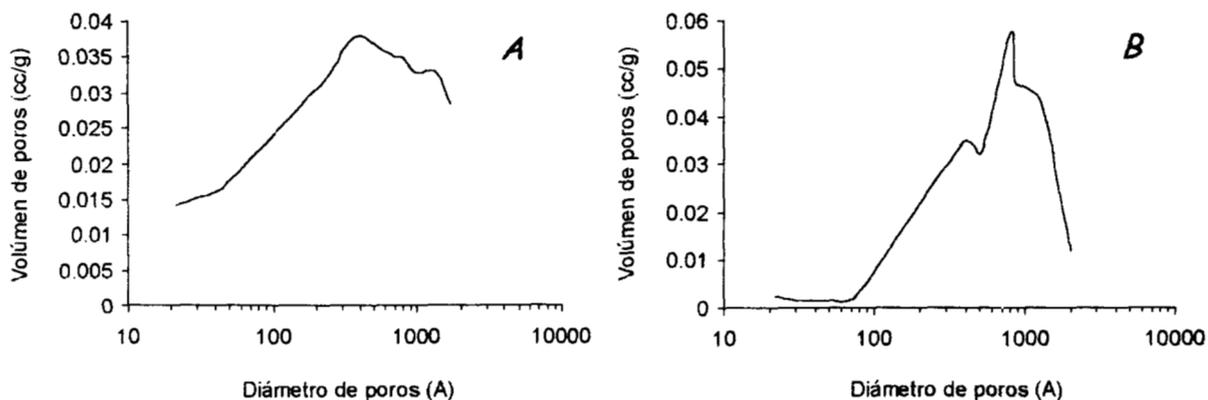


Figura 6.8. Distribución del tamaño de poros.

A) Suelo limpio; B) Suelo contaminado con hidrocarburos.

La tabla 6.1. resume las características de porosidad tanto de los xerogeles como de los suelos analizados. Como ya se mencionó, la polimerización llevada a cabo en presencia de fenantreno favorece la formación de poros más grandes, los xerogeles así obtenidos son similares a los suelos analizados en los cuales una gran cantidad de poros se encuentra alrededor de los 600 Å; es interesante notar que las gráficas de distribución de poros en suelos se modifican por la presencia de hidrocarburos y los poros más pequeños disminuyen en cuanto a cantidad debido a su obstrucción por la presencia de hidrocarburos.

Tabla 6.1. Características de porosidad de xerogeles y suelos.

Muestra	Tamaño promedio de poros.	Mayor cantidad de poros de acuerdo a su gráfica de distribución.
Xerogel sin fenantreno	30 Å	20-50 Å
Xerogel con fenantreno	89.64 Å	200-600 Å
Suelo limpio	114 Å	300-600 Å
Suelo contaminado	305 Å	600 Å

Dado que un suelo es un sistema sumamente complejo compuesto de silicoaluminatos de sodio y de calcio principalmente, es difícil de estudiar y controlar.

El empleo de la sílice preparada en este estudio constituye un modelo simplificado de dichos suelos resultando similares en cuanto a porosidad y capacidad de retención de agua. El método sol-gel es fácil de controlar y permite obtener sílices que semejen más a la realidad de un suelo.

En la figura 6.9. se muestra una microfotografía de un xerogel sintetizado en presencia de fenantreno. No se observan poros grandes que permitieran la colonización interna de los microorganismos; la superficie rugosa y la presencia de una gran fractura en la estructura del xerogel pueden ser sitios que favorezcan el desarrollo superficial de los hongos.

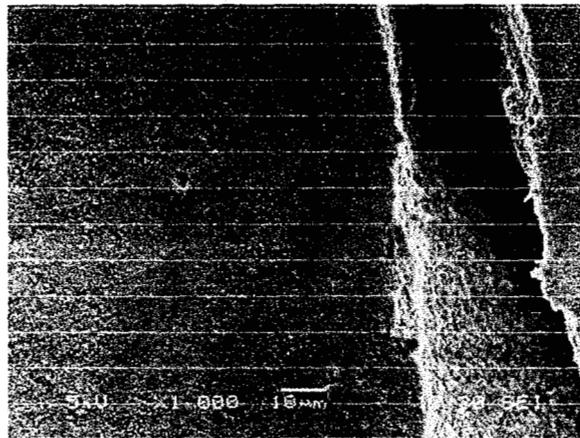


Figura 6.9. Xerogel de SiO_2 usado como soporte inerte (1000X).

Ya que el diámetro promedio de la molécula de fenantreno es 7.94 Å (Gregg y Sing, 1982), puede difundir libremente a través de la red polimérica del xerogel para ser tomada por los microorganismos, que se desarrollen en la superficie.

Este resultado puede ser útil para diseñar una metodología de extracción de fenantreno ya que será necesaria su cuantificación confiable en los experimentos posteriores.

6.4. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL FENANTRENO.

Para la extracción del fenantreno se empleó acetato de etilo como solvente (Sutherland y col, 1991). Se realizaron extracciones sucesivas del xerogel con 250 ppm empleando una relación [1g:10ml], el fenantreno extraído se cuantificó por HPLC, los resultados se muestran en la figura 6.10. Se observa que en la primera extracción fue posible obtener todo el fenantreno del xerogel.

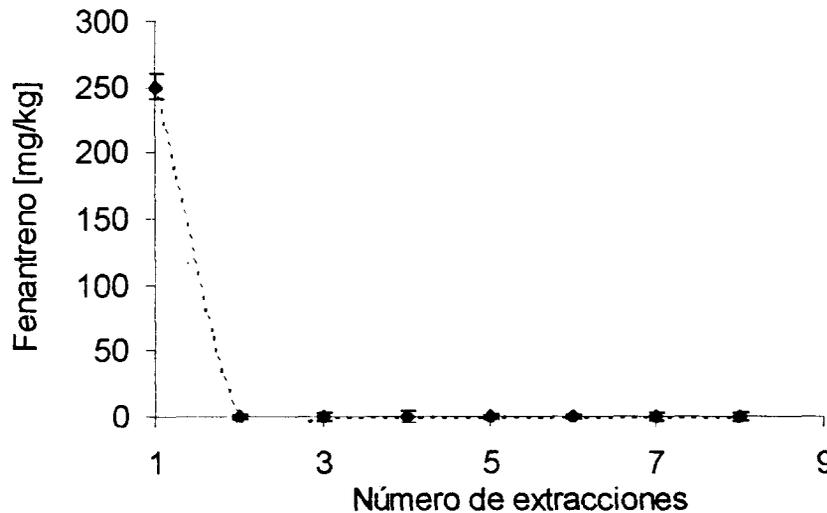


Figura. 6.10. Extracciones sucesivas del xerogel con fenantreno usando acetato de etilo.

Con esto se concluye que es posible la extracción del fenantreno del xerogel usando como solvente acetato de etilo; y sólo es necesario realizar una extracción con dicho solvente para sacar todo el fenantreno.

Debido a que se pretendía trabajar con cultivos puros de una sola especie de hongo filamentoso, es un requisito indispensable cuantificar las pérdidas de fenantreno a consecuencia del proceso de esterilización. Como ya se ha demostrado (ver Anexo II), la pérdida de fenantreno como consecuencia de la volatilidad constituye un importante factor de pérdida que debe ser considerado. A las muestras obtenidas, se les añadió agua hasta alcanzar la humedad de trabajo (30%) y se esterilizaron, después se volvió a analizar su espectro en UV empleando la técnica de reflectancia difusa para analizar exactamente al fenantreno dentro de la matriz de SiO₂. En la

figura 6.11. se observa el espectro antes y después de la esterilización de la muestra polimerizada en presencia de 250 ppm de fenantreno.

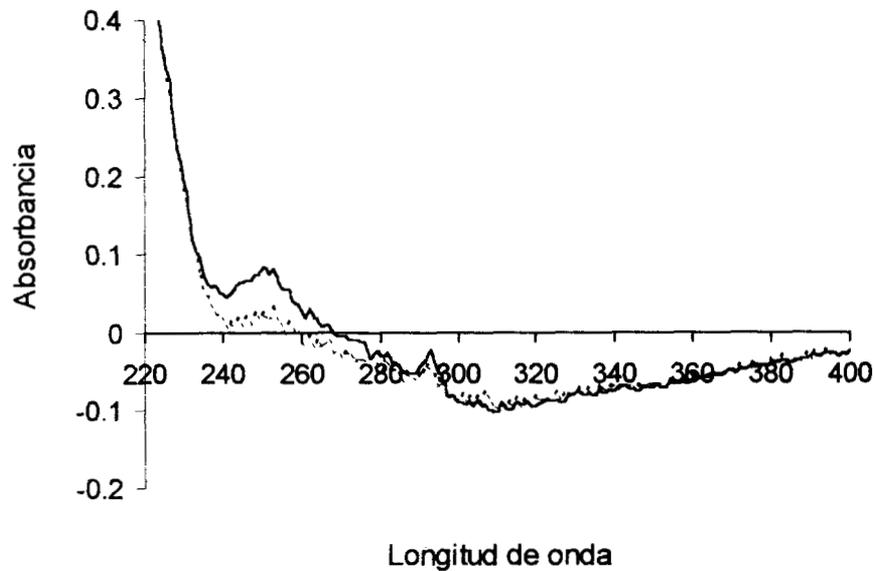


Figura 6.11. Fenantreno extraído de un xerogel con 1500 ppm.

— Antes de la esterilización, Después de la esterilización.

El espectro muestra que no existe descomposición del fenantreno por efecto del calor, los espectros son iguales y únicamente se modifica la intensidad de absorción como consecuencia obvia del cambio en la concentración.

Se observó una importante pérdida de fenantreno (75% del fenantreno inicial), pasando de 250 a 50 ppm en la matriz.

Debido a que en la esterilización se pierde el 75% del fenantreno adicionado durante la polimerización y a que se necesitaba un sistema que representara las condiciones reales que prevalecen en sitios contaminados donde usualmente se encuentran presentes concentraciones de 250 ppm (Weissenfels y col, 1992), se adicionó fenantreno previamente disuelto en hexano (un solvente altamente volátil) en concentraciones tales que se completaran la concentración deseada. La adición se realizó en la campana de flujo laminar y posteriormente se evaporó el solvente. Con este procedimiento se obtuvieron 250 ppm iniciales de fenantreno, de donde 50 están asociadas íntimamente con el xerogel (permanecieron aún después del

proceso de esterilización), y 200 ppm están adicionadas en forma exógena después del proceso de esterilización. Los xerogeles con fenantreno que se emplearon en los cultivos posteriores con los hongos filamentosos seleccionados, fueron preparados con este procedimiento.

225705

6.5. CONCLUSIONES.

Es posible sintetizar xerogeles de SiO_2 con fenantreno, las condiciones que producen los mejores resultados en cuanto a rendimiento y capacidad de retención de agua son una relación molar 1:10 y pH 3.

La presencia de fenantreno durante el proceso de polimerización favoreció la obtención de xerogeles con mayor tamaño promedio de poros (89 Å) en comparación a los xerogeles preparados sin fenantreno (30 Å).

Debido a que durante el proceso de esterilización se pierden el 75% del fenantreno presente en el xerogel, se decidió completar 250 ppm disueltos en hexano mediante una nueva adición. Los xerogeles obtenidos de esta forma fueron empleados como soporte para el desarrollo de los hongos filamentosos.

7. COLONIZACIÓN DEL SOPORTE POR HONGOS FILAMENTOSOS.

Aunque la literatura reporta efectos contradictorios en cuanto al destino de los compuestos orgánicos en la fracción mineral de los suelos, lo cierto es que influye notablemente en la biodisponibilidad de los compuestos contaminantes para las poblaciones microbianas (Selig y col, 1999). Los xerogeles de SiO₂ podrían ser un buen modelo simplificado de este tipo de sistemas, sin embargo inicialmente se deberá demostrar que los microorganismos pueden crecer sobre este soporte.

7.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO SOBRE EL SOPORTE SIN FENANTRENO.

En una primera etapa se trabajó con el xerogel de SiO₂ sin fenantreno a fin de caracterizar el consumo de azúcares, comportamiento de pH y de observar cuidadosamente la morfología de los hongos.

La humedad (% en base húmeda) es un parámetro importante que debe ser tomado en cuenta cuando se realizan estudios en cultivos sólidos. La figura 7.1. muestra su evolución durante todo el tiempo de la fermentación, se observa que el valor para los dos hongos permanece prácticamente constante en 35% hasta el final de la fermentación.

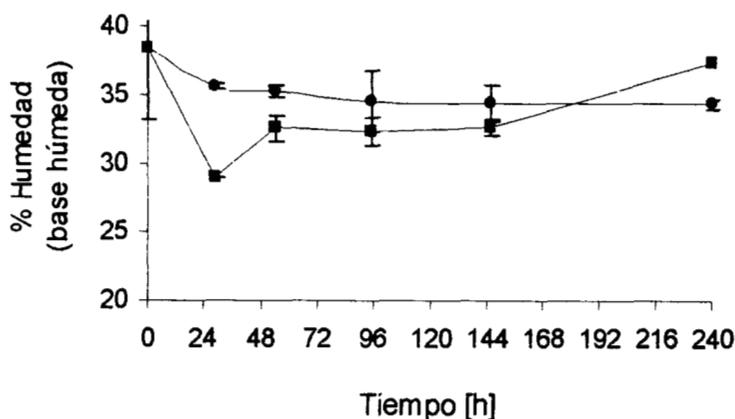


Figura 7.1. Humedad del soporte sin fenantreno durante el crecimiento de los hongos.

(●) *P. chrysosporium* A594, (■) *A. niger* ATCC9642.

Estos valores de humedad son similares a los reportados para suelos (Cepeda, 1996), y permiten el desarrollo de los hongos desde las primeras 29h de cultivo,

como lo revelaron las microfotografías que se muestran en la figura 7.2. donde se puede observar el desarrollo de *P. chrysosporium* (A) y *A. niger* (B) a las 29 h de cultivo. Se observa una gran cantidad de micelio joven con un grosor entre 3 y 2 μm y sin cuerpos fructíferos. Estas observaciones demuestran que el xerogel de SiO_2 es un soporte adecuado que permite el crecimiento de los hongos filamentosos ensayados.



Figura 7.2. Fotografías electrónicas a las 29 h de cultivo.

A. *P. chrysosporium* A594, 2000X, B. *A. niger* ATCC9642, 1700X.

La figura 7.3. muestra la evolución del pH durante la fermentación. Se observa que después de 96h de cultivo el pH permanece prácticamente constante en el caso de *P. chrysosporium*, mientras que para *A. niger* el pH disminuye ligeramente (alrededor de 0.5 unidades de pH); este típico comportamiento del pH en *A. niger* es consecuencia del metabolismo microbiano. *A. niger* produce en forma característica ácidos orgánicos, lo cual explica la disminución inicial del pH (Atkinson y Mavituna, 1991). Al final del cultivo el pH vuelve a incrementarse, posiblemente como consecuencia de lisis celular o al consumo de estos ácidos en las etapas finales del cultivo (Roehr y col, 1992). Hasta el momento no se tienen reportes de que *P. chrysosporium* sea productor de ácidos orgánicos, por lo cual no se esperan cambios en el comportamiento del pH.

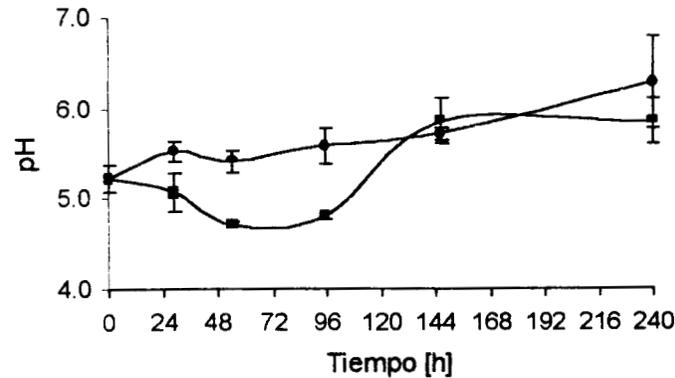


Figura 7.3. Variación del pH durante el cultivo sobre el xerogel de SiO₂ sin fenantreno.

(●) *P. chrysosporium* A594, (■) *A. niger* ATCC9642

La figura 7.4. muestra el consumo de azúcares reductores por los dos hongos. Se puede observar que en ambos casos el azúcar comienza a consumirse rápidamente (alrededor de las 24 horas de cultivo). Al final del cultivo *A. niger* consume el 91.6% de los azúcares reductores iniciales a una velocidad de consumo máxima de 0.075 mg azúcar/g soporte h la cual se presentó entre las 24 y las 96 h de cultivo; por otro lado, *P. chrysosporium* en el mismo tiempo consume sólo el 77.6% a una velocidad de consumo máxima de 0.042 mg azúcar/g soporte h que se presentó entre las 24 y las 144 h de cultivo. Estas diferencias pueden atribuirse a que ambos hongos se desarrollan en forma diferente, es sabido que *P. chrysosporium* crece más lentamente que *A. niger*. (Olsvik y col, 1993, Dhawale y Kessler, 1993).

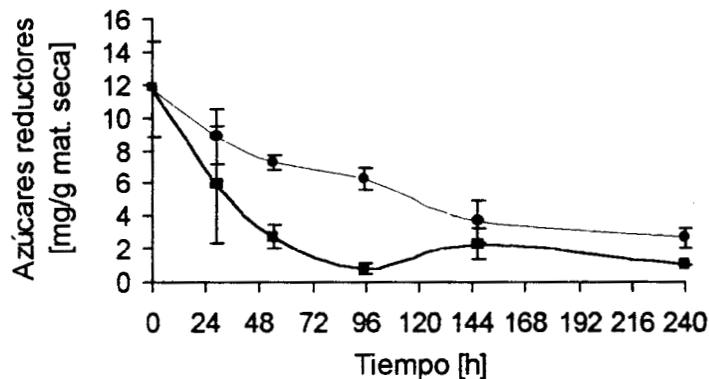


Figura 7.4. Azúcares reductores residuales en el soporte sin fenantreno.

(●) *P. chrysosporium* A594, (■) *A. niger* ATCC9642

En cuanto al consumo total de azúcares, estos resultados muestran ser significativamente mejores a los reportados en trabajos previos (Hang y Woodams, 1987; Gutiérrez-Rojas y col, 1995), en donde se consume únicamente del 50 al 70% de los azúcares totales. Estos resultados confirman que el xerogel de SiO_2 es un soporte adecuado para el crecimiento microbiano y aparentemente no inhibe el consumo de azúcares reductores del medio. Este novedoso soporte para el cultivo de hongos en FMS no había sido reportado anteriormente y constituye un interesante soporte estructuralmente similar a un suelo que pudiera ser empleado como sistema modelo.

En la figura 7.5. se muestran fotografías del microscopio electrónico del crecimiento de *P. chrysosporium* a diferentes tiempos (**A.** 29 h, **B.** 146h); esta fotografía confirma que el crecimiento tiene lugar en la superficie y fracturas del xerogel y que no hay poros tan grandes en el xerogel para permitir la colonización interna de las hifas.

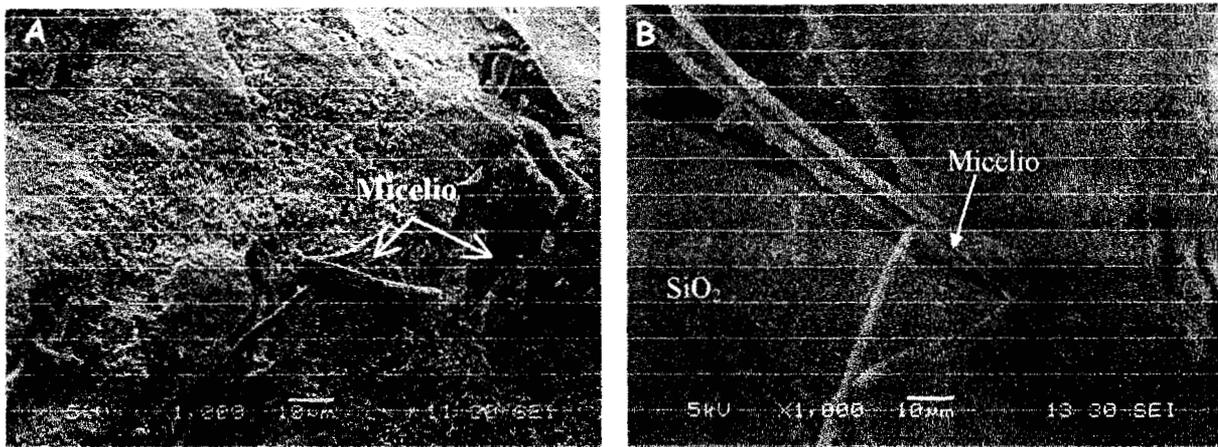


Figura 7.5. *P. chrysosporium* ATCC9642 crecido sobre xerogel de SiO_2 .

A. 29h de cultivo (1000X), B. 146 h de cultivo (1000X).

Por otro lado, la figura 7.6. es un claro ejemplo del crecimiento del micelio en las paredes internas del xerogel. La figura 7.6.B. es una vista de cerca de la figura 7.6.A. Se observa que las hifas emergen de una fractura en el xerogel, es posible que este tipo de fracturas favorezca el alojamiento de las esporas y por lo tanto su desarrollo;

sin embargo, también provocan el desarrollo de cuerpos fructíferos deformados o aplastados, ya que el hongo crece entre dos piezas de xerogel en donde el estrecho espacio entre las piezas provoca que éstos micelios y cuerpos fructíferos se aplasten.

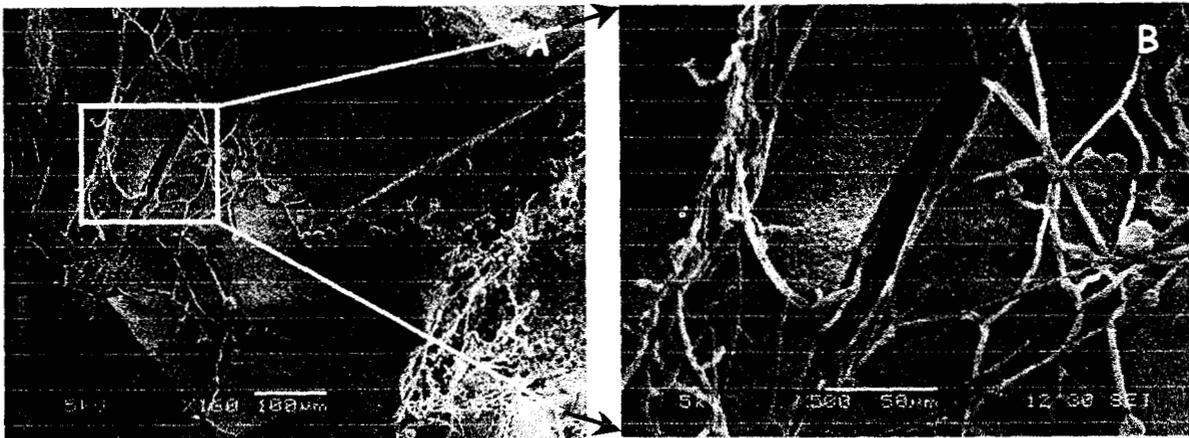


Figura 7.6. *A. niger* ATCC9642 crecido sobre xerogel de SiO₂, 29h de cultivo.

A. 160X, B. 500X.

En estas microfotografías resulta todavía más evidente que el micelio aprovecha las fracturas del xerogel para colonizarlas.

En la mayoría de las observaciones al microscopio las hifas tuvieron un grosor de 3 μm , los esporangios que se muestran en la figura 7.6. tuvieron un diámetro de 16 μm . Estos tamaños típicos de hifas para *A. niger* ya han sido previamente reportados en cultivos superficiales con altas concentraciones de glucosa (Larralde-Corona y col, 1997).

La figura 7.7. muestra la última etapa del cultivo, 240h de incubación. En estas fotografías electrónicas se observa una gran cantidad de cuerpos fructíferos (7.7.A.) y esporas (7.7.B.) ya liberadas. Resulta interesante ver el tamaño de las esporas en comparación al xerogel, es claro que éstas se esparcen sobre la superficie del SiO₂ y es probable que algunas queden atrapadas entre las imperfecciones del mismo, ahí es donde comenzarán a desarrollarse.

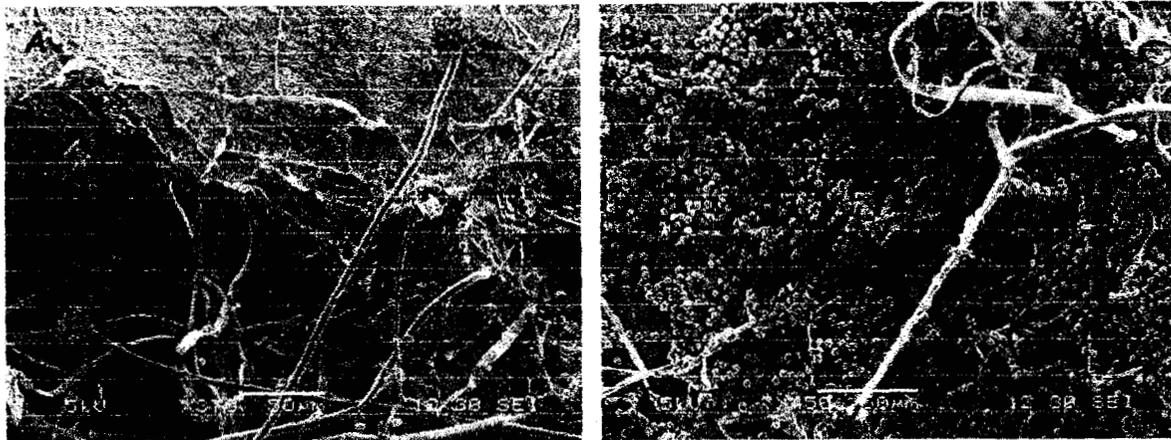


Figura 7.7. *A. niger* ATCC9642 crecido sobre xerogel de SiO₂, 240h de cultivo.

A. 370X, B. 450X.

La figura 7.8. muestra el desarrollo de *P. chrysosporium* en diferentes tiempos **A.** 29h de cultivo, **B.** 146h de cultivo. En ambos casos se aprecia que el desarrollo del microorganismo se lleva a cabo sobre la superficie del xerogel. En la figura 7.8.B. se observa la presencia de un material que podría ser un exopolímero que recubre las hifas por completo, y se sintetiza en las etapas tardías del crecimiento del hongo, después de 146 h de cultivo cuando ya no se observa consumo de azúcares como se puede observar en la figura 7.4.

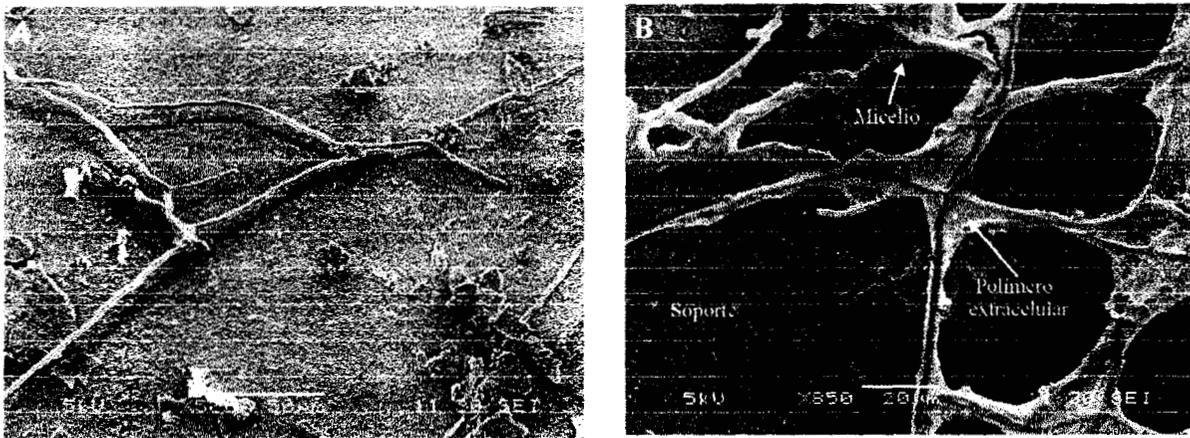


Figura 7.8. *P. chrysosporium* A594 crecido sobre un xerogel de SiO₂.

A. 29 h de cultivo (500X). B. 146 h de cultivo (850X).

En la figura 7.9. se muestra el desarrollo de las hifas de *P. chrysosporium* a las 240h de cultivo. En la figura 7.9.A. se aprecia la presencia de algunos cuerpos fructíferos y la evidente existencia del exopolímero, además de la fusión aparente de algunas hifas. La figura 7.9.B. muestra un campo con menor población de hifas aunque la presencia de algún posible exopolímero sigue siendo evidente.

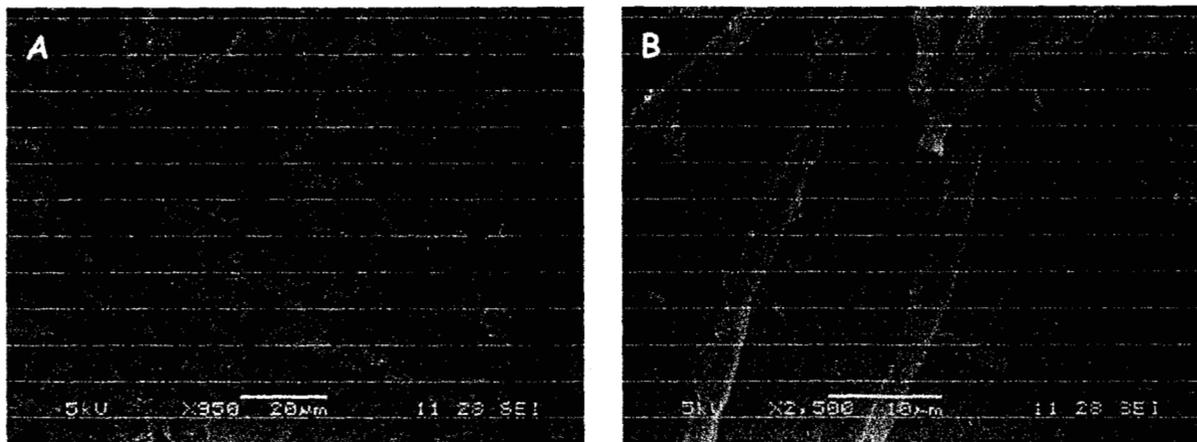


Figura 7.9. *P. chrysosporium* A594 crecido sobre xerogel de SiO_2 , 240h de cultivo.

A. 950X, B. 2500X.

En los ambientes naturales donde se desarrolla *P. chrysosporium*, la presencia del exopolímero alrededor de las hifas tiene la función de unirse covalentemente a las paredes de la madera que es atacada por este tipo de hongos para iniciar su despolimerización (Milstein y col, 1992), así que el exopolímero juega un importante papel en el transporte de las enzimas que despolimerizan la madera (Palmer y col, 1983, Ruel y Joseleau, 1991). La presencia de estas estructuras previamente observadas en este tipo de hongos crecidos sobre su sustrato natural confirma que el uso del xerogel de sílice como soporte para el estudio de este tipo de microorganismos permite emplear un medio de cultivo bien definido y la certeza de que no interferirá en las determinaciones analíticas.

Estos resultados confirman que es posible el uso de xerogeles de SiO₂ como soportes para estudios fisiológicos y bioquímicos de hongos filamentosos. La naturaleza inocua y la alta porosidad de estos geles permite el crecimiento de los hongos ya que proporciona una suficiente capacidad de retención de agua y difusión de nutrientes.

Para comprobar esto, en la siguiente etapa se realizaron cinéticas con los mismos hongos y bajo las mismas condiciones de cultivo pero en presencia de fenantreno.

7.2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO SOBRE EL SOPORTE CON FENANTRENO.

Dado que los suelos contaminados presentan elevadas concentraciones de fenantreno, se decidió trabajar con concentraciones iniciales de 250 ppm, que es lo reportado para algunos tipos de suelos (Weissenfels y col, 1992).

En esta etapa se evaluará si la presencia de fenantreno afecta al desarrollo de los microorganismos así como también si es susceptible o no a ser biotransformado.

Se trabajó con un xerogel con fenantreno (250 ppm iniciales) en botellas serológicas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Del mismo modo, se tomaron muestras cada 24 ó 48 h para realizar los análisis correspondientes. En la gráfica 7.10. se observa la evolución de la humedad durante la fermentación; el comportamiento para ambos microorganismos fue el mismo, permaneciendo constante entre 25 y 30%, aunque la humedad es significativamente menor en este caso comparado con las cinéticas en ausencia de fenantreno estos siguen siendo muy similares a la humedad reportada generalmente en suelos (Cepeda, 1991).

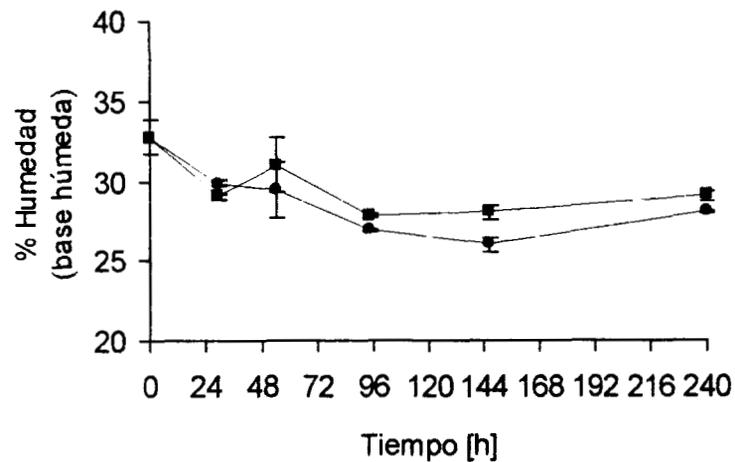


Figura 7.10. Humedad en el soporte con fenantreno.
 (●) *P. chrysosporium* A594, (■) *A. niger* ATCC9642

Estos valores de humedad aparentemente no interfirieron con el desarrollo de los microorganismos, ya que al analizar el comportamiento del pH en la figura 7.11. se observa un comportamiento similar al caso en el que no hay fenantreno copolimerizado con el xerogel. Para el caso de *P. chrysosporium* no existen cambios significativos en el pH mientras que para *A. niger* se presenta una disminución de casi dos unidades de pH como consecuencia, probablemente, de la producción de ácidos orgánicos, mientras que al final del cultivo el pH aumenta nuevamente casi al valor inicial.

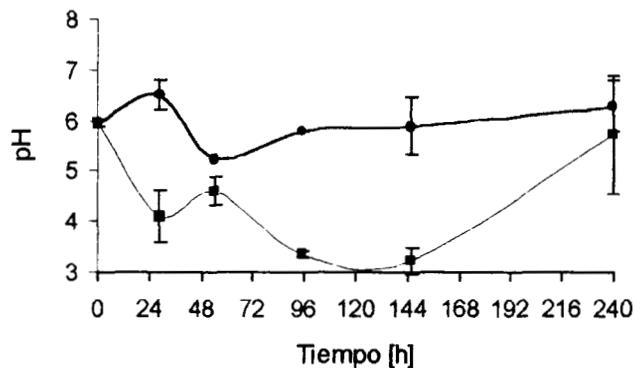


Figura 7.11. pH en el soporte con fenantreno.
 (●) *P. chrysosporium* A594, (■) *A. niger* ATCC9642

Ambos hongos se encuentran creciendo a expensas de los azúcares presentes en el medio de cultivo. La figura 7.12. muestra el consumo de azúcares reductores en donde se observan tendencias muy similares al caso sin fenantreno (capítulo 7.1). *P. chrysosporium* consume el 76.57% de los azúcares reductores del medio de cultivo a una velocidad de 0.046 mg/g soporte h, mientras que *A. niger* consume el 90.36% a una velocidad de 0.106 mg/g soporte h. Comparando con los resultados previamente obtenidos (capítulo 7.1.) se encontró que son prácticamente iguales. Esto sugiere que la presencia de fenantreno en el sistema no afecta al consumo de azúcares, además no se modificó la cinética de pH. Así que, al menos en la concentración de 250 ppm, no se presentan problemas de toxicidad que modifiquen en forma notable la fisiología de los hongos.

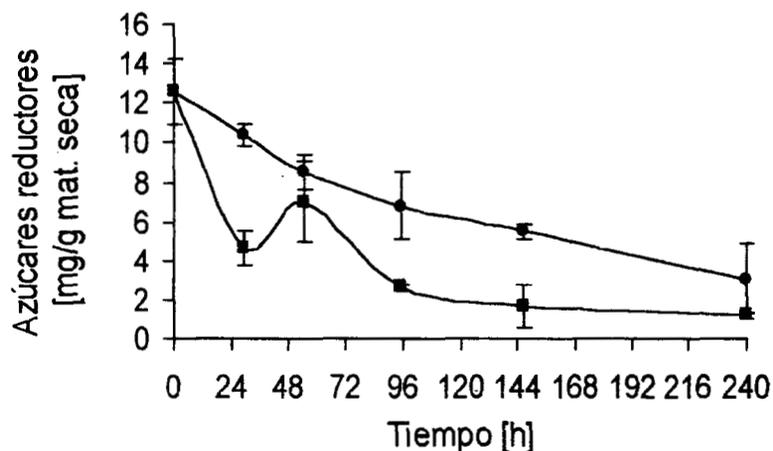


Figura 7.12. Azúcares reductores residuales en el soporte con fenantreno.

● *P. chrysosporium* A594, ■ *A. niger* ATCC9642

En la figura 7.13. se muestra el fenantreno biotransformado por ambos hongos, los valores que se presentan están corregidos con respecto a un blanco sin inóculo (Anexo II), para ello se colocaron botellas serológicas con xerogel y medio de cultivo pero sin inóculo y se incubaron bajo las mismas condiciones. Cada vez que se retiraban muestras para realizar los análisis correspondientes, se tomaban botellas

inoculadas y también de los controles abióticos de los cuales se analizaba la cantidad de fenantreno perdido.

Los resultados muestran que el 25% del fenantreno se biotransforma después de siete días de cultivo y después no hay cambios significativos en el consumo; otros autores han encontrado que en muestras no intemperizadas de suelos, las bacterias presentes en la microflora natural pueden biotransformar entre 43 y 66% de fenantreno en 55 días mientras en muestras intemperizadas (200 días) sólo se biotransforma de 27 a 49% (Chung y Alexander, 1998).

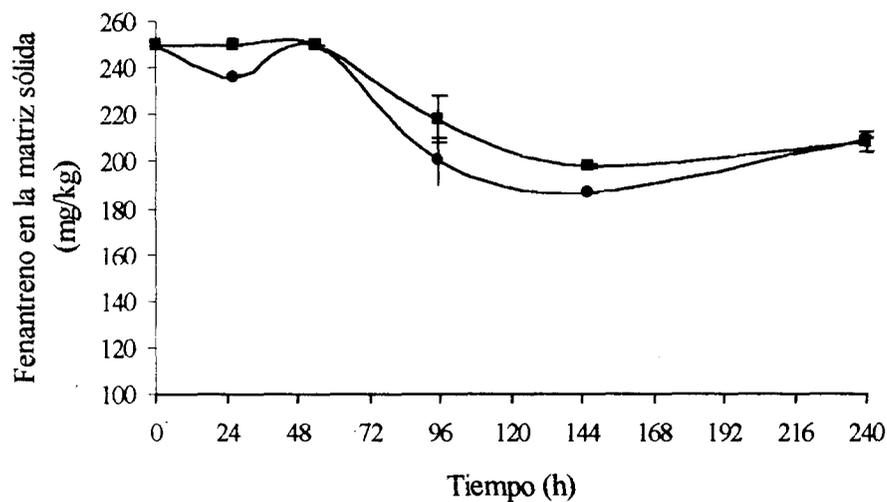


Figura 7.13. Fenantreno biotransformado en el soporte sólido.

● *P. chrysosporium* A594, ■ *A. niger* ATCC9642

Los resultados muestran que la biotransformación de fenantreno por las cepas de *P. chrysosporium* y *A. niger* ocurrió lentamente y sólo se biotransformaron 50 ppm; además la biotransformación se inició desde las primeras 96 h de cultivo y aún existían entre 30 y 40% de los azúcares reductores en el medio.

Resulta interesante que el comportamiento de los dos hongos probados, que morfológica y fisiológicamente son muy distintos, sea similar y hace suponer que los mecanismos que emplean para la biotransformación de fenantreno sean los mismos. Cabe recordar que Hammel y col (1986) demostraron que la lignin peroxidasa no está involucrada en la biotransformación del fenantreno, más recientemente se ha

atribuido al citocromo P-450 la biotransformación de este compuesto (Bezalel y col, 1996).

En la figura 7.14. se muestran microfotografías del micelio de *P. chrysosporium* y *A. niger* en las primeras 29 h de cultivo. Los campos aquí presentados muestran claramente que la colonización del xerogel por el micelio es superficial, lo cual confirma las observaciones realizadas en las experiencias anteriores en donde no había fenantreno en el medio de cultivo. El micelio presentó un grosor de 2 a 3 μm y no se observan diferencias con respecto a los cultivos sin fenantreno.

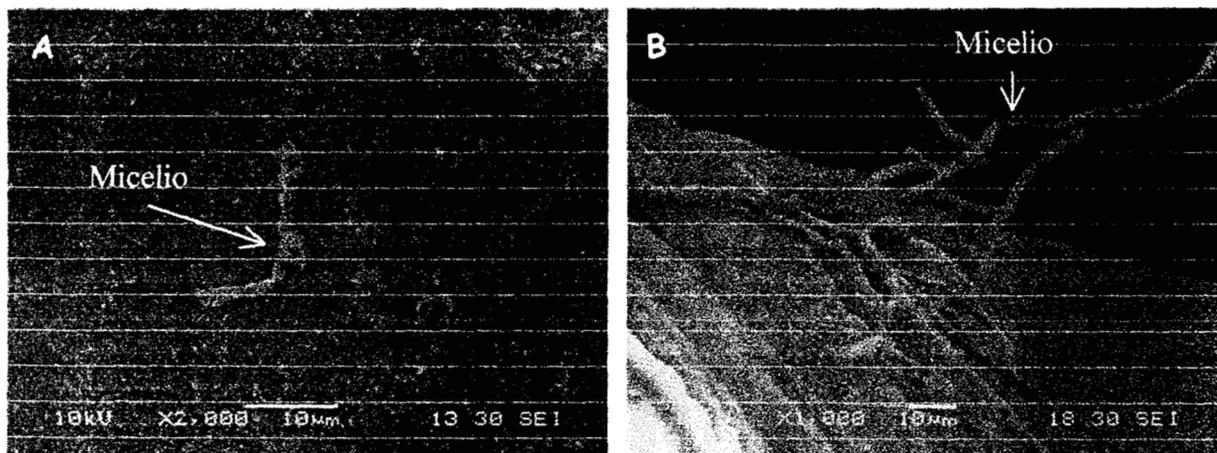


Figura 7.14. Fotografías electrónicas a las 29 h de cultivo.

A. *P. chrysosporium* A594, 2000X, B. *A. niger* ATCC9642, 1000X.

La figura 7.15. A. y B. muestra diferentes campos del cultivo de *A. niger* sobre un xerogel de SiO_2 a las 46h de cultivo, en ambos casos se observa el crecimiento sobre la superficie del xerogel. Aquí también es claro que la colonización ocurre aprovechándose las imperfecciones del xerogel.

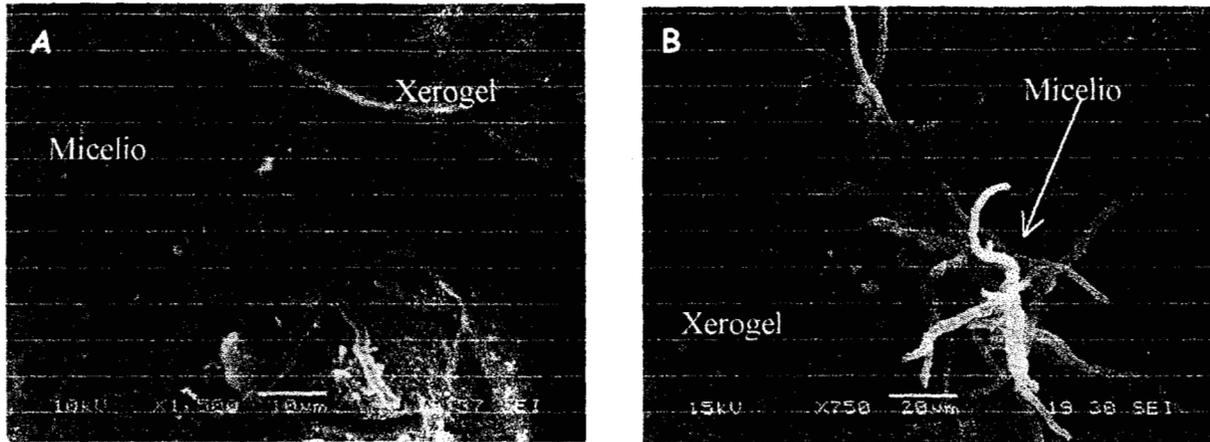


Figura 7.15. *Aspergillus niger* ATCC9642 crecido sobre un xerogel de SiO₂.

A. 146 h de cultivo (1500X), B. 146h (750X)

En la figura 7.16. A. y B. se muestran imágenes de *A. niger* en las últimas horas de cultivo. Al igual que en los cultivos sin fenantreno, la abundancia de cuerpos fructíferos y esporas es evidente, la presencia de fenantreno no alteró ni la morfología de los cuerpos fructíferos ni el tiempo que tardaron en aparecer.

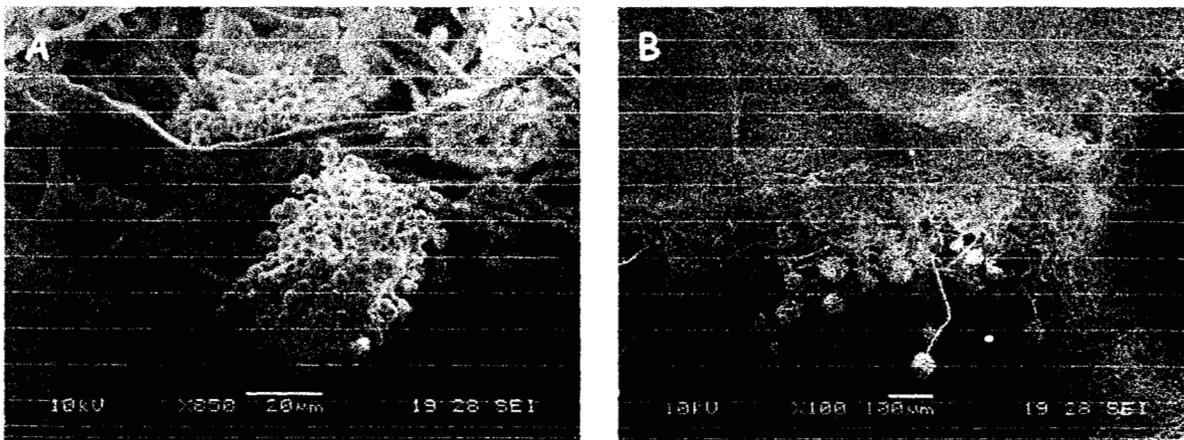


Figura 7.16. *Aspergillus niger* ATCC9642 crecido sobre un xerogel de SiO₂.

A. 240 h de cultivo (850X), B. 240 h (100X)

Finalmente, la figura 7.17. A. y B. muestra imágenes de *P. chrysosporium* A594 a las 146h de cultivo. Se puede apreciar en ambas imágenes que el crecimiento es

abundante y completamente superficial. En algunas partes se notan algunas hifas fusionadas y la presencia de un aparente exopolímero no es tan evidente como en el cultivo anterior, esto podría deberse a que el fenantreno podría ser usado como sustrato y las condiciones aún no son tan críticas como para desencadenar la síntesis de enzimas del metabolismo secundario para la búsqueda de nuevos nutrientes.

También se observan también algunos cuerpos fructíferos. Para este caso tampoco se observan cambios significativos de morfología, el grosor de las hifas sigue siendo de 2-3 μm como en el cultivo anterior.

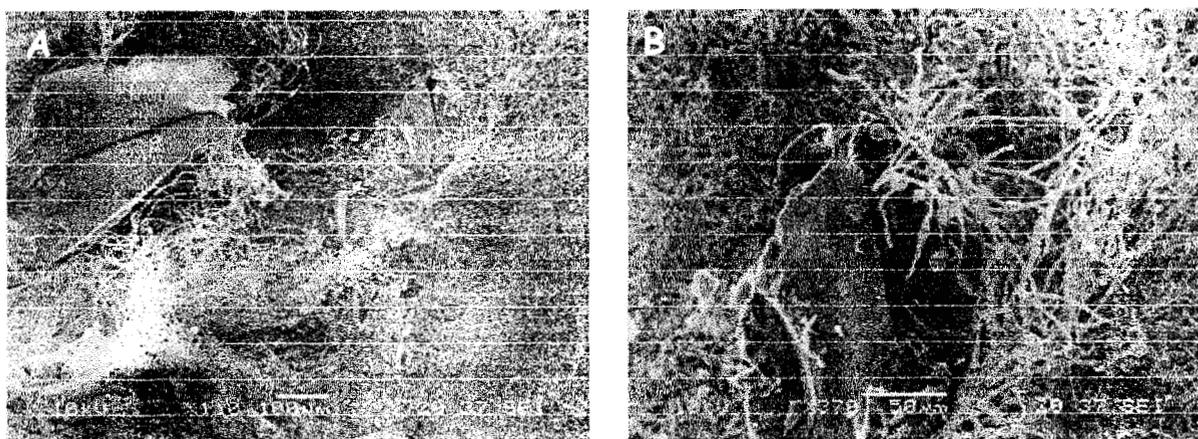


Figura 7.17. *Phanerochaete chrysosporium* A594 crecido sobre un xerogel de SiO_2 .

A. 146 h de cultivo (110X), B. 146h (370X)

De estas observaciones se puede concluir que no existen diferencias aparentes en la fisiología y morfología de *A. niger* ATCC9642 y *P. chrysosporium* A594 cultivándolos en presencia y en ausencia de fenantreno sobre un xerogel de SiO_2 . No se presentan modificaciones importantes en cuanto al comportamiento del pH, consumo de azúcares o morfología al microscopio electrónico.

7.3. Conclusiones.

Es posible el desarrollo de hongos filamentosos sobre un xerogel de SiO₂ previamente polimerizado, la colonización se lleva a cabo superficialmente y se aprovechan las imperfecciones y ocasionales fracturas del xerogel para la colonización.

El fenantreno no interfirió con los perfiles de evolución del pH ni con el consumo de azúcares (se consumió entre 75 y 90% de los azúcares iniciales totales), sugiriendo que los xerogeles de SiO₂ pueden ser empleados como sistemas modelos limpios y fáciles de manejar.

Se observó la presencia de un posible exopolímero producido por *P. chrysosporium* en las etapas finales del cultivo, lo cual podría estar relacionado con la síntesis y transporte de enzimas extracelulares. Estas observaciones demuestran que el xerogel de SiO₂ no interfiere con el desarrollo de los hongos ni con el transporte de metabolitos.

8. ESTUDIOS EN MEDIO LÍQUIDO.

Los estudios en medios líquidos han sido usados en muchas investigaciones para evaluar el potencial de una cepa microbiana para biodegradar PAHs. Debido a que la heterogeneidad de los sistemas sólidos y a los problemas de transferencia que en ellos se presentan, es importante caracterizar a las cepas de hongos filamentosos empleadas en este estudio cultivándolas en medios líquidos. De este modo, se evaluó la biotransformación de fenantreno por *P. chrysosporium* A594 y *A. niger* ATCC9642 en cultivos líquidos, utilizando un medio rico en nutrientes (Sutherland y col, 1991) y cuatro concentraciones de fenantreno (0, 15, 25 y 50 ppm). Posteriormente se determinó la capacidad de los microorganismos para sorber este compuesto en su micelio, y finalmente se realizaron cinéticas de sorción y biotransformación de fenantreno.

8.1. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFORMACIÓN DE FENANTRENO POR *P. chrysosporium* A594 Y *A. niger* ATCC9642.

Inicialmente se evaluó la capacidad de las cepas de hongos empleadas en este trabajo (*P. chrysosporium* A594 y *A. niger* ATCC9642) para biotransformar fenantreno en cultivos líquidos con el medio de cultivo reportado por Sutherland y col (1991), con cuatro concentraciones iniciales de fenantreno: 0, 15, 25 y 50 ppm.

En figura 8.1. se observa el valor de pH para los hongos al final del cultivo. En este caso, también se monitoreó un control sin inóculo a fin de evaluar los cambios abióticos del sistema; con respecto al control, *P. chrysosporium* no modificó notablemente el pH del medio de cultivo; en contraste, *A. niger* disminuyó el pH del medio en casi una unidad. Como es bien conocido, *A. niger* produce ácidos orgánicos lo cual explica la disminución de pH (Atkinson and Mavituna, 1991); *P. chrysosporium* no produce ácidos orgánicos por lo que no se presenta ninguna modificación en el pH durante el transcurso del cultivo.

En ninguno de los dos casos existen diferencias entre los valores de pH encontrados para cada concentración inicial de fenantreno. Este comportamiento típico para

ambos hongos indica que están desarrollándose sin problemas en el medio de cultivo y aparentemente no existen diferencias provocadas por la concentración inicial de fenantreno.

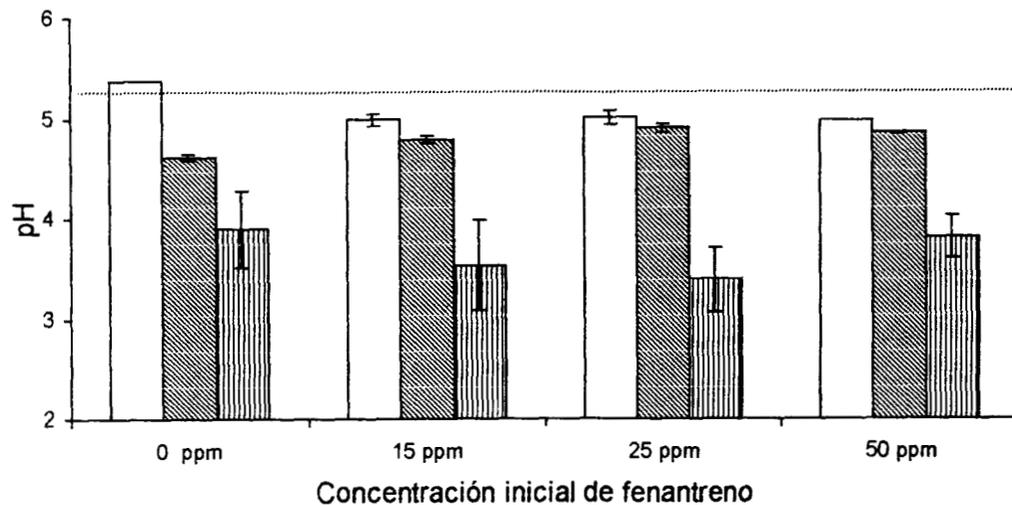


Figura 8.1. Cambio en el pH después de siete días de incubación. pH inicial (□) Control sin inóculo, (▨) *P. chrysosporium* A594, (▤) *A. niger* ATCC9642.

La figura 8.2. muestra la producción de biomasa después de siete días de cultivo para los dos microorganismos en las diferentes concentraciones iniciales de fenantreno. En todos los casos se observa que la producción de biomasa de *P. chrysosporium* fue casi la mitad de la producida por *A. niger*; este resultado no es sorprendente ya que éste último es un hongo de rápido crecimiento en comparación con *P. chrysosporium*.

La biomasa producida por cada especie de hongo con distintas concentraciones iniciales de fenantreno es prácticamente la misma (*P. chrysosporium* A594 produjo siempre alrededor de 2 g/l, mientras que *A. niger* ATCC9642 produjo 8 g/l). Esto puede atribuirse a que las concentraciones iniciales de fenantreno usadas en este estudio no provocan inhibición en el crecimiento de los hongos, no hay efectos tóxicos a las concentraciones empleadas. Dado que la concentración inicial de fenantreno osciló entre 0 y 50 ppm, tampoco se presentó un incremento significativo en la producción de biomasa ya que la cantidad de carbono aportado por el

fenantreno es significativamente menor en comparación a la de los azúcares presentes en el medio de cultivo.

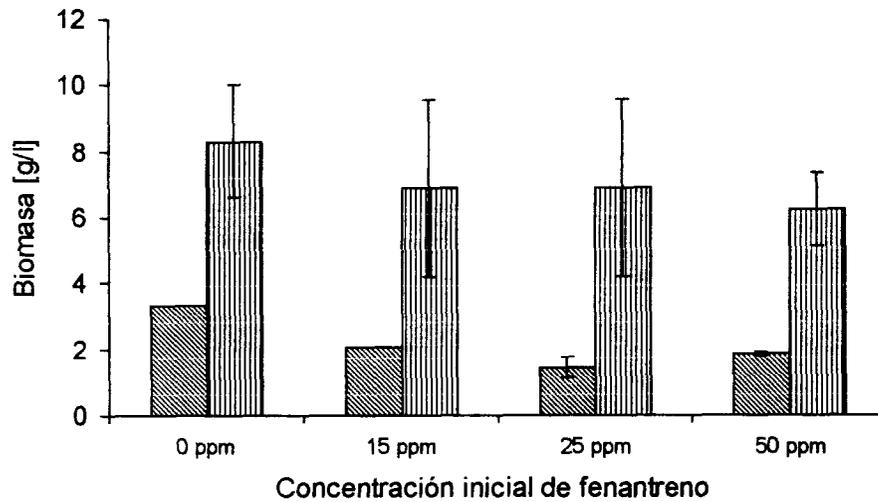


Figura 8.2. Biomasa producida después de siete días de cultivo.

(▨) *P. chrysosporium* A594, (▤) *A. niger* ATCC9642.

En todos los casos se inició con una elevada concentración de azúcar (30 g/l de azúcares reductores). Después de siete días, *P. chrysosporium* consumió aproximadamente 30% de los azúcares mientras que *A. niger* consumió el 44%. En todas las concentraciones iniciales de fenantreno el consumo de azúcares fue similar; estos resultados sostienen la afirmación de que bajo las condiciones trabajadas no se presenta inhibición del metabolismo y crecimiento de los hongos usados en este estudio.

Reportes previos de Barclay, y col. en 1995, demostraron que no existían efectos tóxicos del fenantreno en concentraciones 83 veces menores a las trabajadas en este estudio; resulta interesante que las elevadas concentraciones empleadas en el presente trabajo tampoco sean tóxicas.

En la figura 8.3. se muestra el consumo de fenantreno con respecto al control y al tiempo cero por los dos microorganismos. Se observa que ambos hongos biotransforman fenantreno, el consumo de fenantreno aparentemente depende de la concentración inicial del mismo. *P. chrysosporium* en todos los casos consumió más

del 50% del fenantreno inicial, mientras que *A. niger* consumió el fenantreno en su totalidad en el caso de 15 y 25 ppm, mientras que para 50 ppm consumió alrededor del 90%.

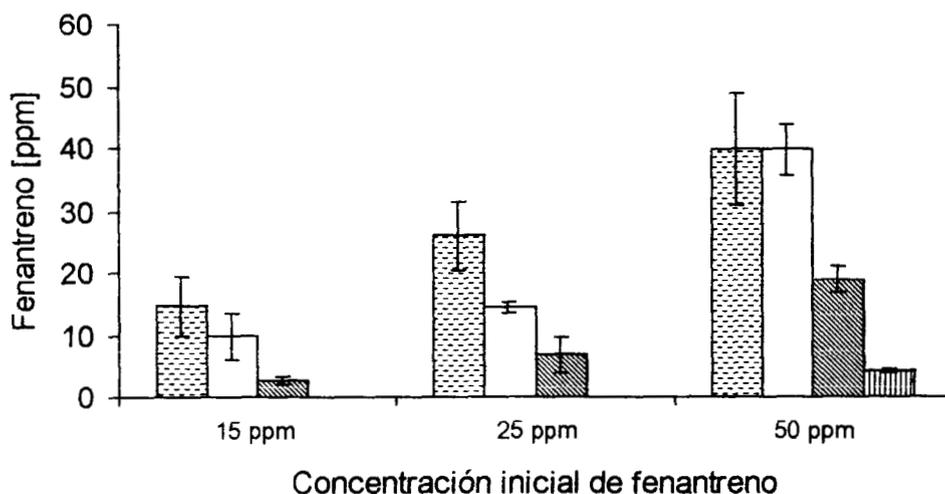


Figura 8.3. Fenantreno residual en el medio de cultivo después de siete días de incubación.

([dotted]) T=0h, ([white]) Control sin inóculo, ([diagonal hatched]) *P. chrysosporium* A594, ([vertical hatched]) *A. niger* ATCC9642.

Estos resultados demuestran que las dos cepas son capaces de biotransformar fenantreno en concentraciones de entre 15 y 50 ppm en medio líquido; dichas concentraciones no son tóxicas para los hongos.

La bibliografía reporta que los hongos pueden sorber compuestos en su micelio, debido a la posibilidad de estar sobreestimando la cantidad de fenantreno biotransformado por los hongos usados en este estudio, se decidió evaluar el fenómeno de sorción de fenantreno en el micelio.

8.2. EVALUACIÓN DE LA SORCIÓN DE FENANTRENO EN LA BIOMASA.

Se ha reportado que el fenómeno de sorción de PAHs juega un papel importante en la desaparición y/o remoción de estos compuestos a partir de la fase acuosa, pero existen pocos trabajos enfocados al estudio de este fenómeno. Barclay y col (1995) encontraron que *P. chrysosporium* es capaz de sorber el 40% del fenantreno inicial después de seis días de cultivo. Por otro lado, Sack y col en 1997 reportaron el mismo fenómeno de sorción en *A. niger*, obteniendo que después de cultivarlo durante 63 días en presencia de fenantreno el 33.9% se detectó asociado al micelio. Debido a estos antecedentes, resulta muy importante evaluar si bajo las condiciones trabajadas el fenantreno es realmente biotransformado o únicamente se sorbe en la biomasa, por lo que se decidió comparar la sorción de fenantreno en biomasa activa y biomasa previamente inactivada por esterilización.

La figura 8.4. muestra la producción de biomasa para los dos hongos utilizados; se observa que siguen la misma tendencia. El nivel de inóculo inicial no es el mismo para *P. chrysosporium* y *A. niger* debido a que se trabajó con la biomasa total crecida en cada matraz después de tres días de incubación, esto para garantizar que la edad del inóculo fuera igual para cada microorganismo. Como ya se había demostrado, *A. niger* ATCC9642 crece más rápido que *P. chrysosporium* A594, por lo tanto tenemos en cada matraz diferentes producciones de biomasa dependiendo del hongo.

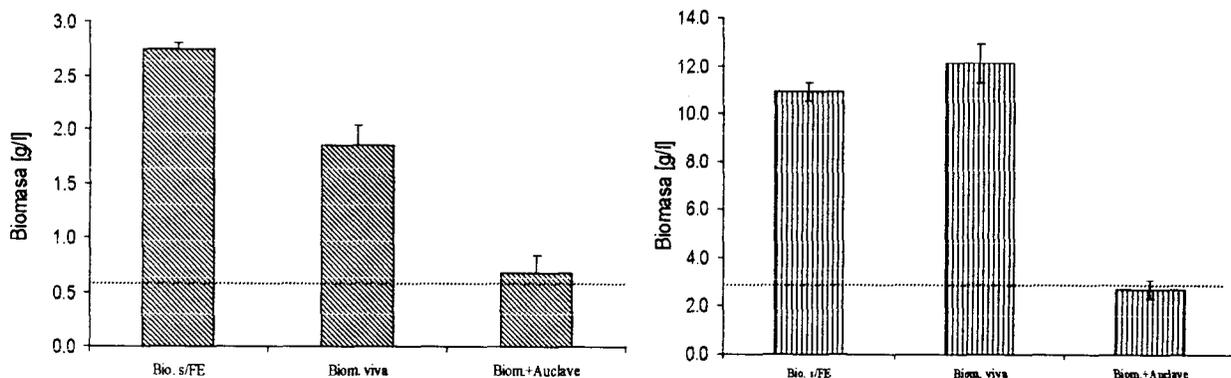


Figura 8.4. Producción de biomasa después de siete días de cultivo. ----- Inóculo inicial.

() *P. chrysosporium* A594, () *A. niger* ATCC9642.

En la biomasa sin esterilizar, la concentración de biomasa aumentó cinco veces en comparación al inóculo inicial y la cantidad final fue similar a la obtenida anteriormente (Sección 8.1.); obviamente debido a que el calor inactiva las funciones celulares, cuando la biomasa se esterilizó no se presentó ningún incremento en la concentración de biomasa con respecto al inóculo inicial.

En cuanto al comportamiento del pH, la figura 8.5. muestra el valor del pH en el medio de cultivo después de siete días de incubación. No se presentaron modificaciones con respecto al tiempo inicial cuando la biomasa fue esterilizada, mientras que cuando al hongo se le permitió seguir desarrollándose, se observa una ligera acidificación del medio de cultivo.

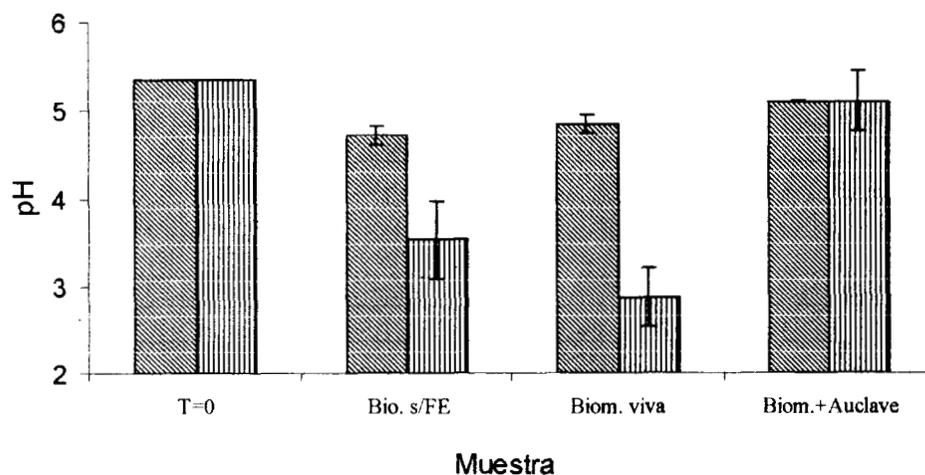


Figura 8.5. pH después de siete días de cultivo.

(▨) *P. chrysosporium* A594, (▤) *A. niger* ATCC9642.

Los resultados del análisis de azúcares reductores mostraron que en la biomasa activa *P. chrysosporium* A594 consumió en todos los casos el 30% de los azúcares reductores mientras que *A. niger* ATCC9642 al final del cultivo consumió alrededor del 44%. Estos resultados indican que los microorganismos puede desarrollarse normalmente en el medio de cultivo empleado.

La figura 8.6.A muestra el fenantreno residual en el medio del cultivo después de siete días de incubación. Tanto la biomasa activa como la esterilizada de los dos hongos, favoreció una disminución de la concentración del fenantreno comparando

con un al blanco sin inóculo. Dado que en la biomasa esterilizada están inhibidas todas las funciones fisiológicas del hongo (Barclay y col, 1995), podemos atribuir dicha desaparición de fenantreno al fenómeno de sorción. En el caso de *A. niger* ATCC9642 la desaparición de fenantreno del medio de cultivo fue mayor que en *P. chrysosporium* A594, tal como ya se había observado anteriormente; esto puede atribuirse a una mayor cantidad de biomasa.

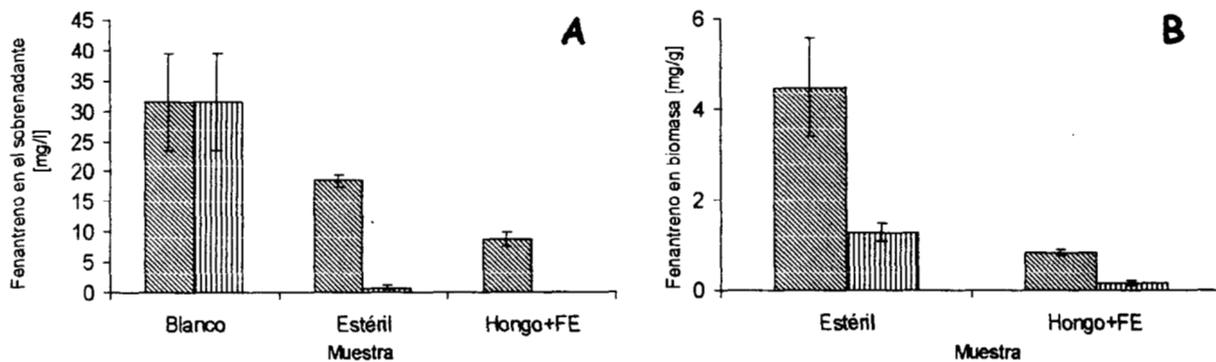


Figura 8.6. Fenantreno en el sobrenadante (A) y sorbido en la biomasa (B).

() *P. chrysosporium* A594, () *A. niger* ATCC9642.

En la figura 8.6.B se observa el fenantreno sorbido por unidad de biomasa, estos valores fueron obtenidos cuantificando la cantidad de fenantreno sorbido en la biomasa de cada hongo (previa extracción con acetato de etilo). En los dos casos la tendencia es la misma, las biomasa esterilizadas de *P. chrysosporium* y *A. niger* son capaces de sorber una gran cantidad de fenantreno (4.5 mg/g y 1.3 mg/g respectivamente). Estos datos son similares a lo reportado por Dhawale y col. (1991) en donde, usando los resultados de biomasa y desaparición biológica de fenantreno por cepas de *P. chrysosporium* (50 ppm iniciales de fenantreno), puede calcularse una desaparición de 6 a 8 mg/g biomasa dependiendo de la cepa que emplean.

Por otra parte, la concentración del fenantreno en la biomasa activa es significativamente inferior comparada con lo obtenido en la biomasa inactivada por esterilización (0.83 mg/g y 0.15 mg/g para *P. chrysosporium* A594 y *A. niger*

225705

ATCC9642 respectivamente), esto hace suponer que el fenantreno es sorbido por la biomasa estéril, y sólo cuando está activa dicho compuesto se biotransforma.

Para calcular el fenantreno biotransformado se realizó un balance por matraz a partir de la siguiente ecuación general de balance (ver Capítulo 5.8.8.) :

$$FE_{\text{entrada}} = FE_{\text{sobrenadante}} + FE_{\text{biomasa}} + FE_{\text{biotransformado}}$$

De la ecuación el único término desconocido es $FE_{\text{biotransformado}}$ y se obtuvo despejándolo de la ecuación.

Así, en la Tabla 8.2. se muestra el balance de fenantreno para *P. chrysosporium* A594. Se observa que alrededor del 10% del fenantreno inicial se recuperó en la biomasa, esto concuerda con la literatura que reporta para condiciones no ligninolíticas y usando el medio de cultivo descrito por Tien y Kirk (1988) con una concentración inicial de fenantreno de 50 ppm, entre el 8 y 13% del fenantreno se encontró asociado al micelio, mientras que Barclay y col (1995) encontraron concentraciones superiores de fenantreno asociado al micelio de este tipo de hongos (alrededor de 40%, empleando concentraciones iniciales de fenantreno inferiores a 1.2 ppm). Por otro lado, en presencia de biomasa viva, únicamente entre 27.47% y 29.84% del fenantreno es biotransformado por este hongo.

Tabla 8.2. Balance de fenantreno por matraz para *P. chrysosporium* A594.

	Biomasa Viva		Biomasa (autoclave)	
	mg/matraz	%	mg/matraz	%
Sobrenadante	0.43±0.05	27.47±3.4	0.92±0.05	58.24±3.06
Biomasa	0.077	4.87±0.03	0.155	9.81
Biotransformado*	1.07	67.55	0.50	31.84
Entrada	1.58±0.28	100	1.58±0.28	100

*Obtenido por diferencia mediante el balance.

La tabla 8.3. resume los resultados del balance de fenantreno para *A. niger* ATCC9642. En todos los casos, más del 60% del fenantreno desapareció del sobrenadante y se sorbió y/o biotransformó.

La biomasa esterilizada sorbió una gran cantidad del fenantreno (48.3%) que representa cinco veces más que lo sorbido por la biomasa de *P. chrysosporium* A594. Sack y col (1997) encontraron que la biomasa de una cepa de *A. niger* después de 63 días de cultivo tenía sorbido el 33.9% del fenantreno inicial. Aunque su estudio en cuanto al balance de fenantreno no es muy específico (sólo cuantifican radiactividad en las diferentes fracciones sin distinguir a todos los metabolitos producidos) conduce a pensar que el menor porcentaje de fenantreno asociado a la biomasa comparado con este estudio se puede atribuir al tiempo de cultivo y a que éste pudo haber sido biotransformado por la cepa que se utilizó.

Tabla 8.3. Balance de fenantreno por matraz para *A. niger* ATCC9642.

	Biomasa Viva		Biomasa (autoclave)	
	mg/matraz	%	mg/matraz	%
Sobrenadante	0	0	0.59	37.7
Biomasa	0.04±0.02	2.8±1.1	0.76±0.11	48.3±6.7
Biotransformado*	1.47	93.3	0.16	10.2
Entrada	1.58±0.28	96.1±17.9	1.58±0.28	96.1±17.9

*Obtenido mediante el balance.

En la figura 8.7. se muestra el fenantreno biotransformado por unidad de biomasa. Se observa claramente que *P. chrysosporium* A594 es capaz de biotransformar cinco veces más FE por unidad de biomasa que *A. niger* ATCC9642; es decir, aunque la biomasa crece más lentamente, aparentemente, resulta más eficiente en la biotransformación del fenantreno. Esto podría atribuirse a que los sistemas enzimáticos producidos por estos microorganismos se expresan en forma diferente o bien, en tiempos distintos; así que el resultado global que se observa después de siete días es significativamente distinto para cada microorganismo.

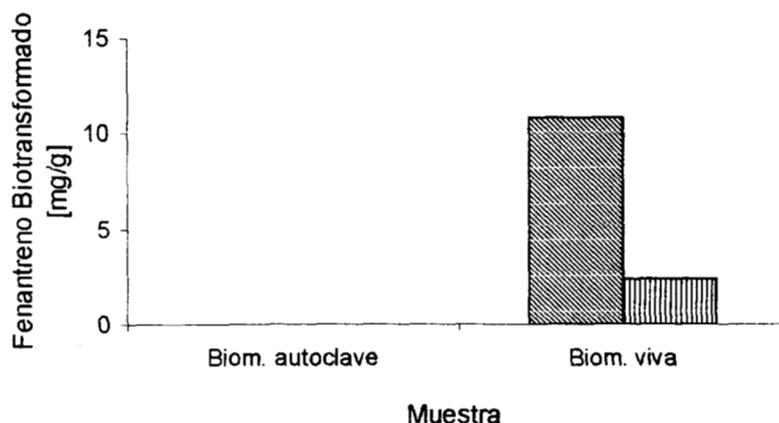


Figura 8.7. Fenantreno biotransformado por la biomasa.
 (▨) *P. chrysosporium* A594, (▤) *A. niger* ATCC9642.

Estos resultados demuestran que aunque hay una cierta cantidad de fenantreno sorbido en la biomasa, una parte importante (más del 50%) es biotransformado por los dos hongos. Ambos microorganismos son efectivos en la biotransformación de fenantreno, *A. niger* ATCC9642 llega a desaparecer el 100% del FE presente en el sobrenadante al final del cultivo debido a que produce una gran cantidad de biomasa. Existe más fenantreno asociado al micelio esterilizado que al micelio vivo, tanto en el caso de *A. niger* como de *P. chrysosporium*, esto sugiere que el fenantreno se sorbe y posteriormente se biotransforma. Con la finalidad de demostrar esta hipótesis se decidió realizar cinéticas de sorción y biotransformación de FE en cultivos líquidos a fin de determinar con mayor exactitud los momentos en los cuales se presentaba el máximo de sorción y el de biotransformación.

8.3. CINÉTICA DE SORCIÓN Y BIOTRANSFORMACIÓN DE FENANTRENO EN MEDIO LÍQUIDO.

En la literatura existen reportes que demuestran que el fenantreno se sorbe en el micelio de los hongos; sin embargo, estos mecanismos aún se comprenden con claridad. El objetivo de realizar una cinética con los microorganismos, fue estudiar el fenómeno de sorción y biotransformación de fenantreno durante el cultivo líquido de *P. chrysosporium* A594 y *A. niger* ATCC9642 a través de balances de masa; para ello se realizaron cinéticas de crecimiento, sorción y biotransformación de fenantreno.

La figura 8.8. muestra el comportamiento del pH para los dos cultivos. Se puede observar que en el caso de *P. chrysosporium*, el pH disminuye ligeramente con el paso del tiempo, mientras que *A. niger* disminuye drásticamente el pH en más de una unidad en 72 h de cultivo, dicho descenso se puede atribuir a la producción de ácidos como consecuencia de la actividad microbiana.

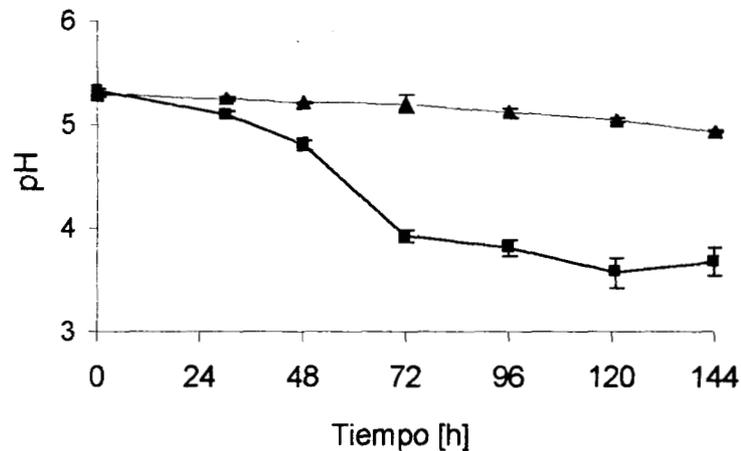


Figura 8.8. Evolución del pH en el sobrenadante de los cultivos líquidos.

(▲) *P. chrysosporium* A594; (■) *A. niger* ATCC9642.

En la figura 8.9. se muestra la cinética de producción de biomasa. Puede observarse que la producción de biomasa se incrementa rápidamente con respecto al tiempo, obteniéndose después de siete días de cultivo una biomasa máxima de 2.8 g/l para *P. chrysosporium* y 7 g/l *A. niger*; en ninguno de los dos casos se observó fase

estacionaria. Esto puede atribuirse a que el medio de cultivo usado es muy rico tanto en carbono como en nitrógeno por lo cual es muy probable que aún tenga nutrientes en el medio y los hongos puedan seguir creciendo si se incuban por un periodo de tiempo mayor.

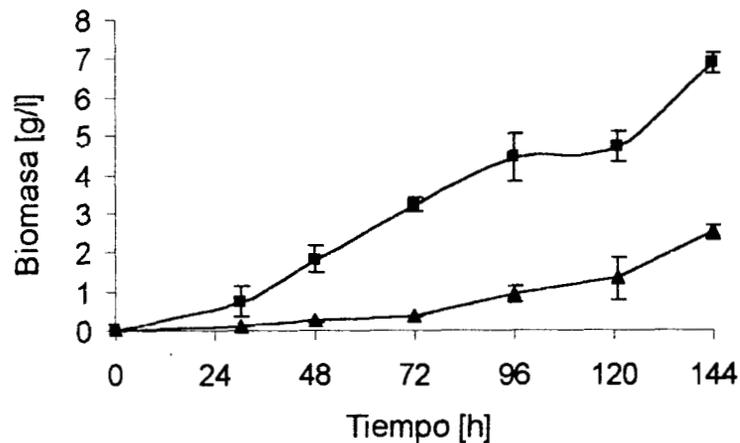


Figura 8.9. Cinética de producción de biomasa para hongos filamentosos en medio líquido.

(▲) *P. chrysosporium* A594; (■) *A. niger* ATCC9642.

Al cuantificar los azúcares reductores remanentes en el medio de cultivo se confirmó que aún existía una gran cantidad de azúcares en el medio de cultivo (de 70 a 60% de los azúcares reductores iniciales); empleando los valores obtenidos de producción de biomasa y consumo de sustrato puede calcularse el $Y_{x/s}$ para el final del cultivo que fue de 0.5 g biomasa/g sustrato, este valor es indicativo de que el medio de cultivo se encontraba balanceado y permitió el desarrollo de los hongos.

Para realizar los balances de fenantreno se siguió la ecuación que se explicó previamente en la sección anterior. En estos experimentos el balance se realizó para cada una de las muestras con respecto al tiempo.

La figura 8.10. muestra la concentración de fenantreno residual en el sobrenadante con respecto al tiempo de cultivo. Se puede observar que en ambos casos, el fenantreno disminuye rápidamente desde las primeras horas del cultivo, desapareciendo casi por completo al final del cultivo.

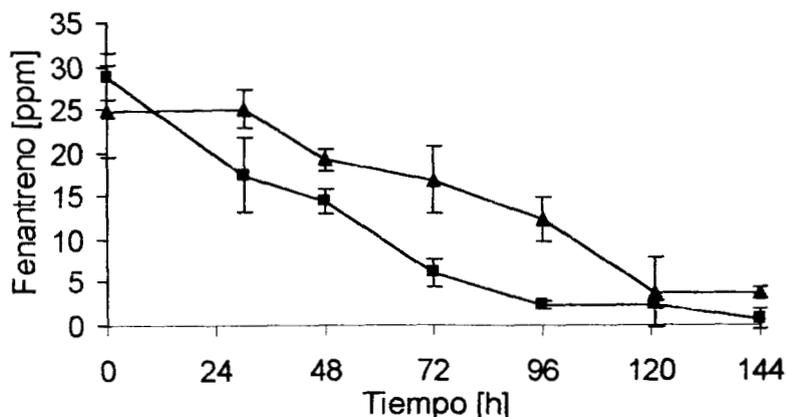


Figura 8.10. Cinética del fenantreno residual en el medio de cultivo líquido después de siete días de cultivo. (▲) *P. chrysosporium* A594; (■) *A. niger* ATCC9642.

En la figura 8.11. se muestra la cinética del fenantreno sorbido en la biomasa (A) y el biotransformado (B). En cuanto al fenantreno sorbido, se observa que en ambos hongos se alcanza rápidamente el máximo seguido de una brusca disminución, hasta permanecer casi constante al final del cultivo. La diferencia radica en que *A. niger* alcanza el máximo de sorción a las 30 h de cultivo con una tasa de sorción máxima de 4.21×10^{-4} mg FE/mg biomasa h, mientras que *P. chrysosporium* lo alcanza hasta las 72 h con una tasa de sorción máxima de 2.8×10^{-4} mg FE/mg biomasa h de cultivo y sorbe dos veces más que *A. niger* (0.02 y 0.013 mg FE/mg biomasa respectivamente).

En cuanto al fenantreno biotransformado, *P. chrysosporium* presenta el máximo de biotransformación a las 96 h con una tasa máxima de biotransformación de 2.1×10^{-4} mg FE/mg biomasa h después de lo cual disminuye abruptamente. En este caso se observa una clara asociación entre los fenómenos de sorción y biotransformación haciéndose evidente el hecho de que es necesario que el fenantreno se sorba por la biomasa para posteriormente ser biotransformado. En el caso de *A. niger*, el máximo de biotransformación se presentó a las 30 h con una tasa máxima de biotransformación de 8.51×10^{-4} mg FE/mg biomasa h, coincidiendo con el máximo de sorción, en este caso también ambos fenómenos se encuentran íntimamente relacionados.

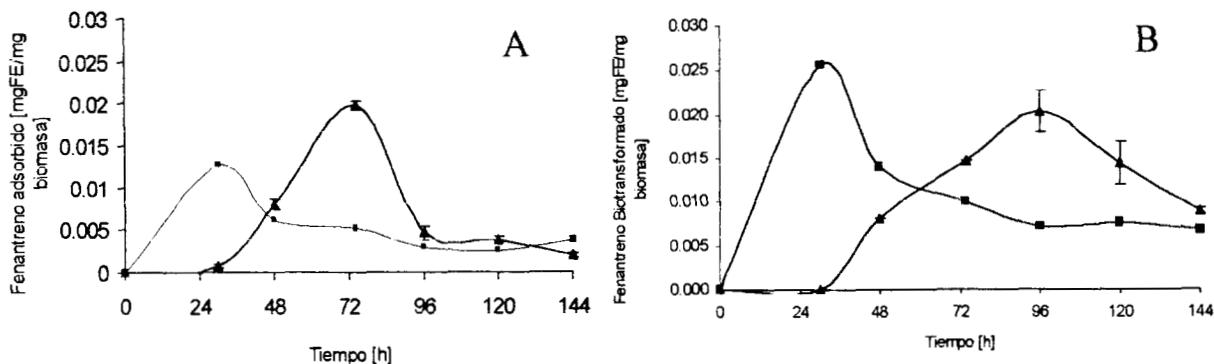


Figura 8.11. Fenantreno: A. Sorbido en la biomasa. B. Biotransformado por la biomasa.

(▲) *P. chrysosporium* A594; (■) *A. niger* ATCC9642.

El fenómeno de sorción ha sido observado previamente por otros autores (Barclay y col, 1995; Sutherland y col, 1991). Barclay trabajó con concentraciones de fenantreno más bajas (0.6 mg/l), mientras que Sutherland y col (1991) usaron [9-¹⁴C]-fenantreno en concentración de 15 ppm y reportaron una sorción de fenantreno en biomasa de $50.2 \pm 18.0\%$ después de siete días de cultivo.

En el caso de hidrocarburos alifáticos se ha demostrado que su sorción se debe a que pueden ser incorporados a la membrana celular de algunas bacterias (Rodgers y col, 2000); se sabe también que dependiendo de la hidrofobicidad característica de la membrana de los microorganismos éstos pueden adherirse a algunos hidrocarburos y usarlos como fuente de carbono; sin embargo, el fenómeno para el caso específico de hongos y de moléculas aromáticas no está bien estudiado.

En base a los intermediarios de la degradación de fenantreno que han podido aislarse de los medios de cultivo, se ha pensado que la biotransformación de este compuesto es catalizada inicialmente por monooxigenasas y epóxido hidrolasas; de acuerdo con los resultados aquí presentados, estas enzimas degradadoras podrían estar asociadas a la membrana o pared celular del hongo como ha sido reportado para algunas bacterias (van Beilen y col, 1992).

En algunos sistemas bacterianos se ha sugerido que el paso limitante de la biotransformación es la baja solubilidad (para el fenantreno, 1.2 mg/l) de los compuestos recalcitrantes (Thomas y col, 1986; Stucki and Alexander, 1987); los

experimentos presentados en esta etapa evidencian que a pesar de haber usado concentraciones por encima del límite de solubilidad del FE (25 mg/l) el mecanismo de sorción y biotransformación puede llevarse a cabo en cepas de *P. chrysosporium* y *A. niger*, sin embargo, son necesarios más estudios para comprender mejor el fenómeno.

8.5. CONCLUSIONES.

A partir de los estudios en medio líquido se puede concluir que *P. chrysosporium* A594 y *A. niger* ATCC9642 son capaces de sorber fenantreno en concentraciones importantes después de siete días de cultivo (4.5 y 1.3 mg/g biomasa respectivamente en la biomasa esterilizada), y también tienen la capacidad de biotransformar al fenantreno desde los primeros días de incubación.

Los resultados demuestran que los fenómenos de sorción y biotransformación de fenantreno se encuentran íntimamente asociados y es condición necesaria que se sorba en el micelio para su transformación.

Esta hipótesis puede extrapolarse a los cultivos sólidos en donde el fenantreno debe migrar a través de la red microporosa hasta la superficie del xerogel, ya en la superficie el micelio puede sorberlos y finalmente ser biotransformarlos.

9. COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS EMPLEADOS POR LOS HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN DE FENANTRENO EN CULTIVO LÍQUIDO Y SÓLIDO.

Numerosas investigaciones utilizan los resultados obtenidos en cultivos líquidos para correlacionarlos con lo que ocurre en suelos; sin embargo, debido a las diferencias entre ambos sistemas, principalmente por las barreras difusionales, un modelo más aproximado a la realidad lo constituye el xerogel de SiO₂ probado en este estudio. En el presente capítulo se pretende establecer una comparación entre los resultados de biotransformación obtenidos en cultivos sólidos y líquidos así como de los sistemas que emplean los microorganismos para biotransformar este compuesto.

9.1. CONSUMO DE FENANTRENO Y VELOCIDADES MÁXIMAS DE CONSUMO EN CULTIVO LÍQUIDO Y SÓLIDO.

Dado que los cultivos líquidos y sólidos difieren principalmente en la biodisponibilidad de los compuestos químicos, en términos generales la cantidad de compuesto biotransformado varía considerable de un cultivo a otro. Esto se observa claramente en la tabla 9.1., donde se muestran los porcentajes de biotransformación para los cultivos realizados. En los cultivos sólidos únicamente se biotransforma un 25% del fenantreno inicial y esta cantidad es igual para los dos hongos usados, en los cultivos líquidos se biotransforma de un 68 a un 93%. El porcentaje de fenantreno biotransformado es tres veces mayor en los cultivos líquidos comparados con los sólidos.

Tabla 9.1. Comparación del consumo de fenantreno por los dos hongos filamentosos estudiados.

	<i>P. chrysosporium</i> A594	<i>A. niger</i> ATCC9642
Fenantreno biotransformado en cultivo sólido (%).	25	25
Fenantreno biotransformado en cultivo líquido (%).	68	93

Estos resultados son similares a los reportados en la literatura donde en suelos intemperizados artificialmente el porcentaje de biotransformación de fenantreno osciló entre 38 y 55% después de 55 días de cultivo (Chung y Alexander, 1998), mientras que del fenantreno sorbido artificialmente en sílice y tierra de diatomeas se biotransformó entre 35 y 58% después de 11 días de cultivo (Nam y Alexander, 1998). Estas diferencias pueden atribuirse principalmente a que la cantidad de fenantreno no es la misma en los dos cultivos; o bien, a que cuando los contaminantes se encuentran sorbidos en una matriz el proceso de biotransformación ocurre más lentamente, en este sentido hay reportes de estudios realizados en cultivos líquidos donde se demuestra que hongos filamentosos cultivados en medio líquido son capaces de biotransformar alrededor del 60% del fenantreno presente en el medio de cultivo después de sólo siete días de cultivo (Sutherland y col, 1991; Barclay y col, 1995).

Debido a que comparar porcentajes de biotransformación no es un buen parámetro ya que la concentración inicial de fenantreno es diferente y esto puede afectar a los hongos, se procedió a realizar un análisis más detallado del proceso de biotransformación evaluando las velocidades específicas máximas de consumo.

Para los cultivos sólidos se estimó la cantidad de biomasa producida en cada caso, considerando para ello un rendimiento de biomasa con respecto a la glucosa consumida de 0.5 de acuerdo a la fórmula 9.1.

$$Y_{x/s} = [(X_f - X_i) / (S_i - S_f)] \quad (9.1.)$$

Para las dos cepas de hongos el máximo consumo se presentó a las 96 h de cultivo. Los resultados del fenantreno biotransformado en ambos tipos de cultivo se muestran en la tabla 9.2.

Tabla 9.2. Comparación de las velocidades máximas de sorción y biotransformación de fenantreno por los dos hongos filamentosos estudiados.

	<i>P. chrysosporium</i> A594	<i>A. niger</i> ATCC9642
Cultivo Sólido		
Velocidad máxima de biotransformación. (mg fenantreno/mg biomasa h).	2.1 X 10 ⁻⁴ (96 h de cultivo)	6.9 X 10 ⁻⁵ (96 h de cultivo)
Cultivo Líquido		
Velocidad máxima de biotransformación. (mg fenantreno/mg biomasa h).	2.1 X 10 ⁻⁴ (96 h de cultivo)	8.51 X 10 ⁻⁴ (30 h de cultivo)
Velocidad máxima de sorción. (mg fenantreno/mg biomasa h).	2.8 X 10 ⁻⁴ (72 h de cultivo)	4.21 X 10 ⁻⁴ (30 h de cultivo)

Se puede observar que en cuanto a velocidad máxima de biotransformación, *P. chrysosporium* no se presentaron diferencias en los diferentes tipos de cultivo; por otro lado *A. niger* mostró una velocidad de biotransformación diez veces menor en cultivo sólido comparada con la de medio líquido.

De los cultivos líquidos se observa también que el fenómeno de biotransformación de fenantreno y su sorción en el micelio están asociados; para el caso de *P. chrysosporium*, el fenantreno es sorbido y alcanza su máximo a las 72 h de cultivo y 24 h más tarde el fenantreno sorbido se biotransforma, en el caso de *A. niger* ambos fenómenos ocurren simultáneamente y la velocidad de biotransformación es dos veces superior a la velocidad de sorción.

Se sabe que los hongos son capaces de sorber algunos compuestos como el hexadecano para incorporarlo a su membrana celular (Rodgers y col, 2000); sin

embargo no existen, en nuestro conocimiento, reportes que hablen acerca de la sorción de moléculas poliaromáticas. Posiblemente el hecho de que el fenantreno sea sorbido en cantidades considerables (superiores al 25% de su concentración en el medio de cultivo) se deba a que su transformación ocurre por la acción de enzimas intracelulares (Sutherland y col, 1991). Dado que las enzimas responsables de la biotransformación de fenantreno no han sido identificadas en los cultivos líquidos es necesario realizar más estudios encaminados a evidenciar y cuantificar a las enzimas responsables de la degradación de fenantreno por hongos filamentosos.

En los cultivos sólidos el comportamiento es diferente, mientras que *P. chrysosporium* biotransforma el fenantreno a la misma velocidad que los cultivos líquidos, *A. niger* lo hace diez veces más lento. Estas diferencias significativas en los dos tipos de hongos sugieren que su comportamiento metabólico es diferente en ambos tipos de cultivo; *P. chrysosporium* fue capaz de biotransformar fenantreno a la misma velocidad en ambos sistemas lo cual podría indicar que mientras que en cultivo líquido se necesita una acumulación de fenantreno en la biomasa y posteriormente este compuesto se biotransforma, en los cultivos sólidos no se necesita dicha acumulación para llevar a cabo la biotransformación. Aunque hacen falta análisis del fenantreno que se encuentra en el interior del micelio, la ausencia de acumulación de fenantreno en el hongo podría atribuirse a que debido a la poca cantidad de azúcares disponibles en este momento (se ha consumido alrededor del 50%) la biotransformación ocurre gracias a las enzimas extracelulares que este hongo es capaz de producir como respuesta a la deficiencia de algunos nutrientes; las enzimas extracelulares son liberadas al medio y pueden llegar hasta el fenantreno que se encuentra en la red polimérica. En la literatura se reporta que tanto en medios con limitaciones de nutrientes como en aquellos donde la cantidad de nutrientes es suficiente, el fenantreno puede ser biotransformado lo cual sugiere que *P. chrysosporium* en particular tiene múltiples vías enzimáticas para biotransformarlo (Sutherland y col, 1991; Dhawale y col, 1992; Barclay y col, 1995).

Para *A. niger* no existen reportes acerca de producción de enzimas extracelulares por lo cual la biotransformación en este sistema debe ser también intracelular, igual que en los cultivos líquidos. En este caso para que el fenantreno sea biotransformado, la única posibilidad es que migre desde el interior de la matriz polimérica hasta la superficie donde está desarrollándose el hongo, una vez biodisponible es sorbido por el hongo y se biotransforma (Pingnatello y Xing, 1996), por esta razón el proceso se hace mucho más lento en los sistemas de cultivo sólido.

Los cultivos sólidos realizados usando como soporte a un xerogel de SiO₂ son sistemas que permiten el estudio del comportamiento metabólico de microorganismos más fácilmente. En este caso fue posible determinar que dos hongos filamentosos presentan un comportamiento diferente dependiendo del sistema donde son cultivados.

9.2. CONCLUSIÓN.

Los resultados de las velocidades de biotransformación de fenantreno tanto en cultivo líquido como en cultivo sólido para *P. chrysosporium* son iguales (2.1×10^{-4} mg fenantreno/mg biomasa h), mientras que para *A. niger* la velocidad de biotransformación de fenantreno en cultivo sólido es diez veces menor que en cultivo líquido (6.9×10^{-5} y 8.51×10^{-4} mg fenantreno/mg biomasa h respectivamente). Estos resultados sugieren que los mecanismos metabólicos involucrados en la biotransformación de fenantreno son diferentes en ambos microorganismos y dependen del tipo de cultivo.

El metabolismo de los microorganismos involucrados en la degradación de fenantreno es un factor tan importante como los mecanismos de difusión de contaminantes que ha sido ampliamente estudiados y reportados en la literatura.

Conclusión General

9. Conclusión General.

Se sintetizaron xerogeles de SiO₂ con porosidad de 89Å y capacidad de retención de agua de 2.5-3.5 gH₂O/g xerogel, que son similares a las de un suelo. Los xerogeles sintetizados resultaron ser sólidos mesoporosos con distribución de tamaño de poros similar a un suelo de tipo franco-arenoso de Veracruz.

Los xerogeles permitieron el desarrollo de los dos hongos filamentosos estudiados sobre su superficie tanto en presencia como en ausencia de fenantreno (250 ppm). En ninguno de los dos casos se observaron diferencias significativas en la morfología o capacidad de consumo de azúcares, sugiriendo que la presencia de fenantreno a la concentración utilizada no tiene efectos negativos sobre los microorganismos.

Los xerogeles de SiO₂ pueden ser usados como modelos de estudio de suelos contaminados con la ventaja de ser sistemas más limpios y homogéneos, además son más sencillos en la interpretación de resultados.

En los cultivos sólidos, *P. chrysosporium* A594 consumió el 77% de los azúcares presentes, mientras que *A. niger* ATCC9642 consumió el 92%. Sin embargo, los dos hongos biotransformaron la misma cantidad de fenantreno (50 ppm), esta cantidad resulta similar a la reportada en la literatura para suelos contaminados confirmando que el xerogel de SiO₂ es un buen modelo de suelo.

En los cultivos líquidos se encontró que aunque una parte importante se sorbe en el micelio (entre 0.015 y 0.02 mg de FE/mg biomasa), también otra parte similar se biotransforma (entre 0.020 y 0.025 mg de FE/mg biomasa). Las cinéticas de sorción y biotransformación de fenantreno mostraron que los dos fenómenos están íntimamente relacionados: en el caso de *P. chrysosporium* A594 se observaron velocidades de sorción y biotransformación de 2×10^{-4} mg fenantreno/mg biomasa h, inicialmente se sorbió una gran cantidad de fenantreno (a las 72 h de cultivo) y 24 h

más tarde se biotransformó. En el caso de *A. niger* ATCC9642, los máximos de sorción y biotransformación se observaron a las 30 h de cultivo, esto sugiere que tan pronto como se sorbe el compuesto inicia su biotransformación.

Las velocidades específicas de biotransformación de fenantreno en cultivo líquido son diez veces superiores a las de sólido para *A. niger* (8.51×10^{-4} y 6.9×10^{-5} mg fenantreno/mg biomasa X h), esto sugiere que las moléculas contaminantes deben difundir desde el interior de la matriz para llegar a la superficie y estar en contacto con el micelio que las sorberá y finalmente biotransformará; este sistema puede explicar la lenta biotransformación que ocurre en los sistemas sólidos. En los cultivos de *P. chrysosporium* las velocidades específicas de biotransformación fueron iguales (2.1×10^{-4} mg fenantreno/mg biomasa h), dado que los problemas difusionales son inherentes a los cultivos sólidos se puede pensar que las velocidades del mismo orden de magnitud se deben a que las enzimas involucradas en la biotransformación de fenantreno son distintos.

Recomendaciones

10. RECOMENDACIONES.

Este trabajo es una propuesta inicial para un uso novedoso del sistema sol-gel. Se demostró que es posible emplearlo como modelo de estudio de suelos contaminados; sin embargo, es evidente que hacen falta estudios que empleen otros tipos de microorganismos, por ejemplo bacterias que también están presentes en los suelos. Además, también es posible utilizar otro tipo de molécula o mezclas de éstas, lo cual complica el sistema pero lo acerca aún más a la realidad.

Sería interesante realizar estudios profundos en relación a los fenómenos de transporte en los que se encuentra involucrado el fenantreno. Resulta importante conocer la velocidad con la cual el fenantreno se adsorbe y desorbe de la matriz de sílice quedando biodisponible para los microorganismos. Además, es posible mejorar el sistema para aproximarlos más a un suelo y realizar también estudios de transferencia de masa.

El xerogel es una nueva propuesta de soporte para profundizar estudios en medio sólido; su uso como soporte para el crecimiento de hongos puede extenderse a otros tipos de estudios básicos sobre morfología y fisiología de microorganismos industrialmente interesantes, por ejemplo, en la producción de metabolitos y enzimas.

Con la finalidad de comprender mejor por qué los hongos adsorben fenantreno y posteriormente lo biotransforman, es necesario realizar estudios sobre composición de membrana y pared celular, analizando la cantidad de fenantreno que se acumula en la membrana celular. Además es importante estudiar los mecanismos de transporte de nutrientes en presencia y ausencia de fenantreno.

Son necesarios estudios sobre adsorción de fenantreno en la biomasa de los hongos cuando éstos se cultivan en medio sólido; para ello sería necesario implementar una metodología encaminada a separar la biomasa del soporte a fin de poder analizar el fenantreno adsorbido en ambas fracciones por separado.

Resultaría interesante identificar y cuantificar los metabolitos producidos a partir de fenantreno, así como determinar cuáles se acumulan en las células y en el medio. Estos resultados ayudarían a comprender mejor la ruta metabólica para la degradación del fenantreno tanto en los cultivos líquidos como en los sólidos, ya que hasta el momento no se ha reportado la ruta completa de degradación hasta CO_2 y H_2O .

Es importante realizar ensayos enzimáticos específicos para determinar cuáles son las enzimas involucradas en el proceso de biotransformación de fenantreno, tanto en cultivo líquido como en cultivo sólido. Así mismo, es necesario determinar la ubicación de las enzimas ya que aparentemente el inicio de la biotransformación podría atribuirse a enzimas cercanas a la pared celular de los hongos.

Referencias Bibliográficas

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Aitken M.D., Stringfellow W.T., Nagel R.D., Kazunga C. y Chen S.H. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Can. J. Microbiol.** 44 : 743-752.
- Aravantinos-Zafiridis G., Tzia C., Oreopoulou V. y Thomopoulos C.D. (1994). Fermentation of orange processing wastes for citric acid production. **J. Sci Food Agric.** 65 : 117-120.
- Atkinson B. y Mavituna F. (1991). *Biochemical engineering and biotechnology handbook.* (Macmillan Publisher LTD, Great Britain), Pág. 1173-1176.
- Auria, R., Hernández, S., Raimbault, M. y Revah, S. (1990). Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. **Biotech. Technol.** 4(6) : 391-396.
- Baker K.H. y Herson D.S. (1994). Microbiology and biodegradation. En: *Bioremediation.* Baker K.H. y Herson D.S. (eds). Mc. Graw-Hill. Págs. 9-60.
- Barclay C.D., Farquhar G.F., y Legge R.L. (1995). Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42 : 958-963.
- Barr D.P. and Aust S. (1994). Pollutant degradation by white rot fungi. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.** 138 : 49-72.
- Bezalel L., Hadar Y., Fu P.P., Freeman J.P., and Cerniglia C.E. (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 (7) : 2547-2553.
- Blumer M., Blumer W. y Reich T. (1977). Polycyclic aromatic hydrocarbon in soils of a mountain valley: Correlation with highway traffic and cancer incidence. **Environ. Sci. Technol.** 11 (12) : 1082-1084.

- Braun S., Shtelzer S., Rappoport S., Avnir D. y Ottolenghi M. (1992). Biocatalysis by sol-gel entrapped enzymes. **J. Non.-Cryst. Solids.** 147&148 : 739-743.
- Brinker C.J. y Scherer G.W. (1990). *Sol-Gel Science. The physic and chemistry of sol-gl processing.* Academic Press, Inc. E.U.A. Pág. 103-107.
- 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.
- Bumpus J.A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 (1) : 154-158.
- Campostrini R., Carturan G., Caniato R., Piovan A., Filippini R., Innocenti G, y Cappelletti E.M. (1996). Immobilization of plan cells in hybrid sol-gel materials. **J. Sol-Gel Sci. and Tech.** 7, 87-97.
- Casillas R.P., Crow S.A. Jr., Heinze T.M., Deck J. y Cerniglia C.E. (1996). Initial oxidative and subsequent conjugative metabolites produced during the metabolism of phenanthrene by fungi. **J. Ind. Microbiol.** 16 : 201-215.
- Cepeda J.M.D. (1991). Constituyentes minerales. En *Química de suelos.* Trillas. México. 17-42.
- Cerniglia C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Curr. Opin. Biotechnol.** 4 : 331-338.
- Cerniglia C.E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **J. Ind. Microbiol. and Biotechnol.** 19 : 324-333.
- Cerniglia E., Sutherland J.B. y Crow S.A. (1992). Fungal Metabolism of aromatic hydrocarbons. En *Microbial Degradation of Natural Products.* Winkelmann G. (ed.) VCH Publisher. E.U.A. Págs. 194-217.
- Cornelissen G., Van Noort P.C.M. y Govers H.A.J. (1998). Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents. **Environ. Sci. Technol.** 32 (20) : 3124-3131.

- Chung N. y Alexander M. (1998). Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. **Environ. Sci. Technol.** 32 : 855-860.
- Dalton H. y Stirling D.I. (1982). Co-metabolism. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** 297, 481-496.
- Dhawale S.W., Dhawale S.S., y Dean-Ross D. (1992). Degradation of phenantrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (9) : 3000-3006.
- Dhawale S.S. y Kessler K. (1993). Alternative methods for production and staining of *Phanerochaete chrysosporium* basidiospores. **Appl. Environ. Microbiol.** 59(5) : 1675-1677.
- Dutta T.K. y Harayama S. (2000). Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. **Environ. Sci. Technol.** 34 (8) : 1500-1505.
- Ellerby L.M., Nishida C.R., Nishida F., Stacey A.Y., Dunn B., Valentine J.S. y Zink J.I. (1992). Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method. **Science.** 255 : 1113-1115.
- Faison B.D. y Kirk T.K. (1985). Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 49 (2) : 299-304.
- Farrel J., Grassian D. y Jones M. (1999). Investigation of mechanisms contributing to slow desorption of hydrophobic organic compounds from mineral solids. **Environ. Sci. Technol.** 33 (8) : 1237-1243.
- Field J.A., Jong E., Costa G.F., y Bont J.A.M. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungus. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (7) : 2219-2226.
- Gregg S.J. y Sing K.S.W. (1982). *Adsorption, surface area and porosity*. Academic Press. U.S.A. Pág.1-40.
- Gutiérrez-Rojas, M., Córdova, J., Auria, R., Revah, S. y Favela-Torres E. (1995). Citric acid and polyols productions by *Aspergillus niger* at high glucose

- concentration in solid state fermentation on inert support. **Biotech. Letters.** 17 (2) : 219-224.
- Hammel K., Kalyanaraman B. y Kirk T.K. (1986). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo [p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. **J. Biol. Chem.** 261 (36) : 16948-16952.
- Hammel K., Gai W.Z., Green B. y Moen M.A. (1992). Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (6) : 1832-1838.
- Hang Y.D. y Woodams E.E. (1987). Effect of substrate moisture content on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. **Biotech. Letters.** 9 (3) : 183-186.
- Harms H. y Bosma T.N.P. (1997). Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 18 : 97-105.
- Huesemann M.H. (1997). Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils: limitations in bioavailability or inherent recalcitrance? **Bioremediation** 1(1) : 27-39.
- Hughes J.B. Beckles D.M., Chandra S.D. y Ward C.H. (1997). Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. **J. Ind. Microbiol. Biotech.** 18 : 152-160.
- Kamath A.V. y Vaidynathan C.S. (1990). New pathway for the biodegradation of indole in *Aspergillus niger*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56 (1) : 275-280.
- Ko S.H. y Lebeault J.M. (1999). Effect of a mixed culture on co-oxidation during the degradation of saturated hydrocarbon mixture. **J. Appl. Microbiol.** 87 : 72-79.
- Lakshminarayana K., Chaudhary K., Ethiraj S. And Tauro P. (1975). A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagasse. **Biotechnol. Bioeng.** 17, 291-293.
- Larralde-Corona P., López-Isunza F., y Viniegra-González G. (1997). Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. **Biotechnol. Bioeng.** 56 (3) : 287-294.

- Lawlor K., Sublette K., Duncan K., Levetin E., Buck P. Wells H. Jennings E., Hettenbach S., Bailey S., Fisher J.B. y Todd T. (1997). Long -term effects of crude oil contamination and bioremediation in a soil ecosystem. **Bioremediation Journal**. 1 (1) : 41-51.
- Livage J., Barreau J.Y., Da Costa J.M. y Desportes I. (1994). Optical detection of paratic protozoa in sol-gel matrices. **Sol-Gel Optics III**. 2288 : 493-503.
- Livage J. (1996). *Bioactivity in sol-gel glasses*. C.R. Acde. Sci. Paris, Série II b. P. 417-427.
- Livage J., Babonneau F., Chatry M. y Coury L. (1997). Sol-gel synthesis and NMR characterization of ceramics. **Ceramics International**. 23 : 13-18.
- Luthy R.G., Aiken G.R., Brusseau M.L., Cunnigham S.D., Gschwend P.M., Pignatello J.J., Reinhard M., Traina S.J., Weber Jr. W.J. y Westall J.C. (1997). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. **Environ. Sci. Technol.** 31 (12) : 3341-3347.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31 (3) : 426 : 428.
- Milstein O., Gersonde R., Huttermann A., Chen M.J. y Meister J.J. (1992). Fungal biodegradation of lignopolystyrene graft copolymers. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (10) : 3225-3232.
- Moen M.A. y Hammel, K.E. (1994). Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. **Appl. Environ. Microbiol.** 60 : 1956-1961.
- Mudgett E.R. (1986) Solid state fermentation. En *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. A.L. Demian And N.A. Solomon, eds. American Society for Microbiology Washington D.C. Pág. 66-83.
- Nam K. y Alexander M. (1998). Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: test with model solids. **Environ. Sci. Technol.** 32 (1) : 71-74.

- Olsvik E., Tucker K.G., Thomas C.R. y Kristiansen B. (1993). Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. **Biotech. Bioeng.** 42 : 1046-1052.
- Palmer J.G., Murmanis L., y Highley T.L. (1983) Visualization of hyphal sheath in wood-decay hymenomycetes. II. White-rotters. **Mycologia.** 5 : 1005-1009.
- Pease E.A. y Tien M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Bacteriol.** 174 (11) : 3532-3540.
- Peralta-Pérez M.R., Saucedo-Castañeda G., Gutiérrez-Rojas M. y Campero A. (2001). SiO₂ Xerogel: A Suitable Inert Support for Microbial Growth. **J. Sol-Gel Sci. Technol.** 20 : 105-110.
- Pignatello J.J. y Xing B. (1996). Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. **Environ. Sci. Technol.** 30 (1) : 1-11.
- Pope E.J.A. (1995). Gel encapsulated microorganisms: *Saccharomyces cerevisiae*-Silica gel biocomposites. **J. of Sol-Gel Sci. and Technol.** 4, 225-229.
- Pope E.J.A., Braun K. y Peterson C.M. (1997). Bioartificial organs I: Silica gel encapsulated pancreatic islets for the treatment of diabetes mellitus. **J. of Sol-Gel Sci. and Technol.** 8, 635-639.
- Pothuluri J. V., Selby A., Evans F.E., Freeman J.P., y Cerniglia C.E. (1995). Transformation of chrysene and other polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by the fungus *Cunninghamella elegans*. **Can. J. Bot.** 73 (Suppl. 1) : S1025-S1033.
- Rama-Mercier R., Mougín C., Sigoillot J.C., Sohier L., Chaplain V. y Asther M. (1998). Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biotechnol. Tech.** 12 (10) : 725-728.
- Reddy C.A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Current Opinion in Biology.** 6 : 320-328.
- Rodgers R.P., Blumer E.N., Emmett M.R. y Marshall A.G. (2000). Efficacy of bacterial bioremediation: demonstration of complete incorporation of hydrocarbons into

- membrane phospholipids from *Rhodococcus* hydrocarbon degrading bacterial by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Environ. Sci. Technol.** 34 : 535-540.
- Roehr M., Kubicek C.P. y Kominek J. (1992). Industrial acids and other small molecules. En *Aspergillus Biology and Industrial Applications*, Bennett J.W. y Klich M.A. (ed). Butterworth-Heinemann. E.U.A. Pág. 92-131.
- Ruel K., y Joseleau J.P. (1991). Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of populus wood by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 : 374-384.
- Sack U., Heinze T.M., Deck J., Cerniglia C.E., Cazau M.C. y Fritsche W. (1997). Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (7) : 2906-2909.
- Sanchez C. y Livage J. (1990). Sol-gel chemistry from metal alkoxide precursors. **New J. Chem.** 14(6-7), 513-521.
- Schwarzenbach R.P., Gschwend P.M. e Imboden D.M. (1993). "Biological transformations reactions". En *Environmental Organic Chemistry*. Wiley-Interscience Publication. E.E.U.A. Pág.491-494.
- Selig H., Hayes K.F. y Adriaens P. (1999). The role of dissolved silica on the biodegradation of octylamine. **Environ. Sci. Technol.** 33 : 3723-3729.
- Shankaranand V.S., Ramesh M.V. y Lonsane B.K. (1992). Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. **Process Biochem.** 27, 33-36
- Soccol, C.R. (1996). Aplicaciones agroindustriales de los procesos de fermentación en medio sólido. En: **Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería**. De Galindo, E. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 346-358.
- Stucki G. y Alexander M. (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 53 : 292-297.

- Sutherland J.B., Selby A.L., Freeman J.P., Evans F.E., y Cerniglia C.E. (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 (11) : 3310-3316.
- Tang J., Carroquino M.J., Robertson B.K. y Alexander M. (1998). Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Environ. Sci. Technol.** 32 (22) : 3586-3590.
- Thomas J.M., Yordy J.R., Amador J.A., y Alexander M. (1986). Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 52(2) : 290-296.
- Tien M. y Kirk K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in Enzymology.** 161 : 238-249.
- Tongpim S. y Pickard M.A. (1999). Cometabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene trans-9,19-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the presence of phenanthrene. **Can. J. Microb.** 45:369-376.
- Tran Ch.T. y Mitchel D.A. (1994). Pineapple waste – A novel substrate for citric acid production by solid state fermentation. **Biotech. Letters.** 17(10) : 1107-1110.
- Trzesicka-Mlynarz D. y Ward O.P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. **Can. J. Microbiol.** 41 : 470-476.
- van Beilen J.B., Penninga D. y Witholt B. (1992). Topology of the Membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. **J. Biol. Chem.** 267 (13) : 9194-9201.
- Wackett L.P. y Gibson D.T. (1982). Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*. **Biochem. J.** 205:117-122.
- Weissenfels W.D., Klewe H.J., y Langhoff J. (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36 : 689-696.

Wunder T., Kremer S., Sterner O. y Anke H. (1994). Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by *Aspergillus niger* SK 9317. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 42 : 636-641.

Zhu Y., Smits J.P., Knol W. and Bol Tno J. (1994). Polyurethane foam as a novel support for solid state fermentation. **Biotech. Letters.** 16, 643-648.

Apéndices

APÉNDICE I.

TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL FENANTRENO.

Para la extracción del fenantreno, tanto de los cultivos líquidos como de los sólidos, se empleó acetato de etilo como solvente de extracción, el fenantreno extraído se cuantificó mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).

Inicialmente se realizó una curva patrón en un intervalo de concentraciones de 0 a 10 ppm de fenantreno en dimetilformamida. Los estándares se filtraron empleando membranas de teflón de 0.45 µm y una jeringa de vidrio; se inyectaron por duplicado en el HPLC.

En la figura I.1. se muestra el cromatograma típico de un estándar. Se puede observar que no hay interferencias con la definición del pico de fenantreno (tiempo de retención: 6.2 min.).

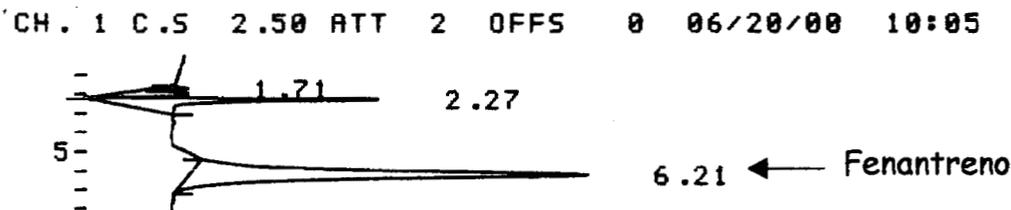


Figura I.1. Cromatograma de un estándar de fenantreno en acetato de etilo (9 ppm).

En la figura I.2. se presenta la curva patrón que se obtuvo bajo estas condiciones. El coeficiente de correlación r^2 fue de 0.9978.

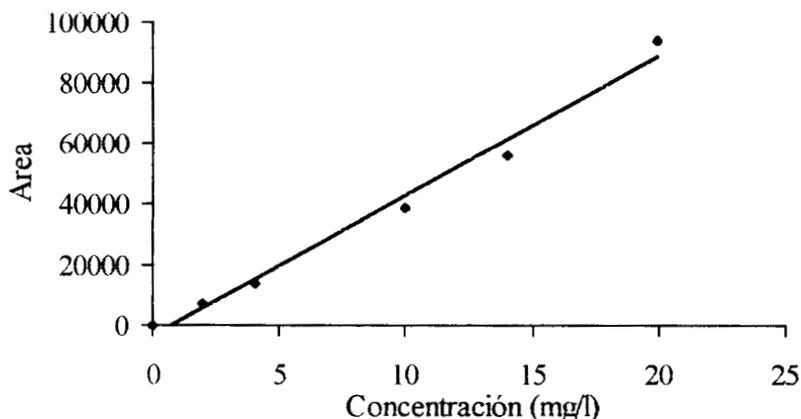


Figura I.2. Curva patrón de fenantreno en acetato de etilo.

Ecuación de la recta: $y = 4589.2X - 3096.9$

Con esta curva patrón se cuantificó el fenantreno verificando cada 30 muestras con un estándar. El tiempo de retención osciló siempre entre 5.4 y 6.2 min.

La figura I.3. **A.** y **B.** son, respectivamente, cromatogramas de muestras extraídas de cultivos sólido para *P. chrysosporium* A 594 y *A. niger* ATCC9642 después de 240 h de cultivo. Aunque aparecen algunos otros picos, ninguno de ellos interfiere con el pico del fenantreno.

**A****B**

Figura I.3. Cromatogramas de muestras extraídas con acetato de etilo después de 240h de incubación.

A. *P. chrysosporium*. B. *A. niger*.

Estos resultados demuestran que la cromatografía de líquidos es un excelente método para la cuantificación de fenantreno, por esta razón se le empleó rutinariamente a lo largo del desarrollo de la tesis.

APÉNDICE II.

TRANSFORMACIÓN ABIÓTICA DEL FENANTRENO.

En la naturaleza, la degradación de los compuestos contaminantes ocurre principalmente por factores bióticos; sin embargo, los factores abióticos como la fotooxidación y la evaporación (Dutta y Harayama, 2000) no se deben despreciar.

Se han reportado pérdidas importantes de fenantreno por factores abióticos cuando se cultivan hongos filamentosos en medios líquido, dichas pérdidas oscilan entre 31 y 41% del fenantreno inicial después del cultivo a 37°C por cinco días (Dhawale y col, 1992).

Debido a que este tipo de transformación puede presentarse en los sistemas de estudio propuestos, se decidió evaluarla empleando matraces Erlenmayer de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo y 25 ppm de fenantreno inicial. Por triplicado se colocaron matraces tapados con un tapón de algodón o tapón de hule forrado de papel aluminio, también se colocaron blancos sin fenantreno. Se incubaron a 60°C en una estufa para acelerar el proceso de transformación abiótica de fenantreno. Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante 24 h, se extrajeron con acetato de etilo y se realizó un barrido de cada muestra en el espectrofotómetro (de 200 a 400 nm).

En la figura II.1. se muestra el espectro del blanco (medio de cultivo incubado sin fenantreno). No se presentaron cambios en el espectro con el tiempo, lo cual puede atribuirse a que ningún otro compuesto presente en el medio de cultivo se extrae con acetato de etilo por lo cual no hay interferencias con los espectros del fenantreno.

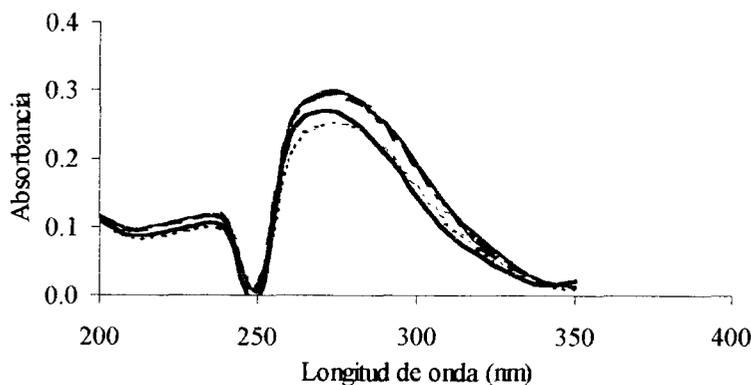


Figura II.1.. Blanco sin fenantreno. — T=0h, T=1h, T=2h, - . T=5h, ___ T=23h

En las figuras II.2. **A** y **B** se muestran los espectros del fenantreno incubado junto con el medio de cultivo. Típicamente el fenantreno en acetato de etilo presenta un pico de máxima absorción a una longitud de onda de 254 nm, en ambas figuras se observa la disminución del pico con el paso del tiempo. Se presentó una disminución de hasta 50% en la absorbancia del fenantreno cuando el medio se incubó usando tapones de algodón, mientras que cuando se emplearon tapones de hule forrados de papel aluminio sólo disminuyó alrededor del 25%. A las concentraciones ensayadas la absorbancia y la concentración del fenantreno son directamente proporcionales, entonces se puede decir que la desaparición del fenantreno es atribuible a su volatilización ya que, como se observa en ambas figuras, no se presentó modificación en el espectro (aparición de nuevos picos o corrimiento de éstos); además, se observa una menor pérdida cuando se emplean tapones de hule forrados de aluminio en comparación con los matraces que tenían tapones de algodón cuya porosidad permite que moléculas volátiles puedan escapar con mayor facilidad.

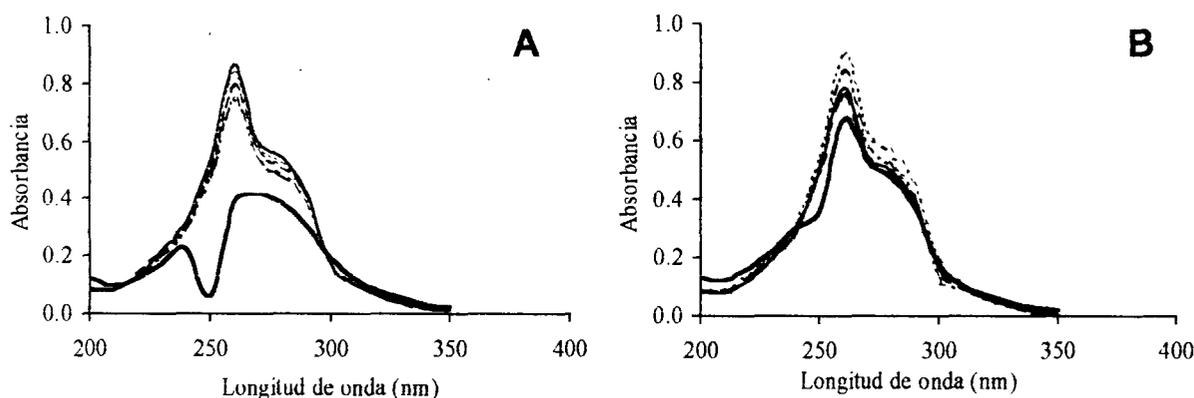


Figura II.2. Fenantreno (25 ppm): **A.** Tapón de algodón, **B.** Tapón de hule.

— T=0h, ——— T=1h, - - - T=2h, - · - T=5h, ——— T=23h

Trabajos previos han mostrado que el fenómeno de volatilización constituye un factor importante en la pérdida de PAHs incluyendo al fenantreno. Rama-Mercier y col, en 1998, encontraron que en controles de cultivos líquidos sin microorganismos incubados a 25°C durante 28 días, el 85% del fenantreno se volatilizaba. Esta

afirmación fue posible debido a que realizaron sus cultivos en completa oscuridad (eliminando el fenómeno de fotooxidación) y además se emplearon trampas para el fenantreno volatilizado a fin de realizar balances de materia con mayor exactitud.

El fenómeno de volatilización del fenantreno en los cultivos es muy importante, por esta razón en todos los experimentos se trabajó con blancos sin inóculo a fin de restar el fenantreno perdido por volatilización y no sobreestimar la biotransformación de éste.

APÉNDICE III.

SiO₂: IMPORTANCIA DEL ÁREA SUPERFICIAL Y LA POROSIDAD DE LOS MATERIALES.

El área superficial y la porosidad juegan un papel complementario en los fenómenos de adsorción de la mayoría de los sólidos. Las mediciones de adsorción de los vapores de gases pueden dar información importante acerca del área superficial y la estructura de poros de un sólido.

Cuando un sólido se expone en un espacio cerrado a un gas a presión definida, éste comienza a adsorber el gas y el proceso está acompañado de un incremento en el peso del sólido y un decremento de la presión del gas. Después de un tiempo la presión se vuelve constante a un cierto valor p , y el sólido deja de incrementar su peso. La cantidad de gas adsorbido puede calcularse a partir de la caída de presión por aplicación de la ley de los gases si se conocen los volúmenes del envase y del sólido, o bien se determina directamente como el incremento en peso del sólido en caso de que se cuente con una balanza.

Para un determinado gas adsorbido en un sólido particular a temperatura constante se tiene:

$$n = f(p)_{T, \text{ gas, sólido}}$$

La expresión anterior es una isoterma de adsorción. La mayoría de las isotermas de adsorción son el resultado de adsorciones físicas y se agrupan en cinco clases (de I a V) de acuerdo a la clasificación original de Brunauer, Emmett y Teller (BET) (Gregg y Sing, 1982).

En la figura III.1. se muestran los cinco tipos más comunes de isotermas que existen.

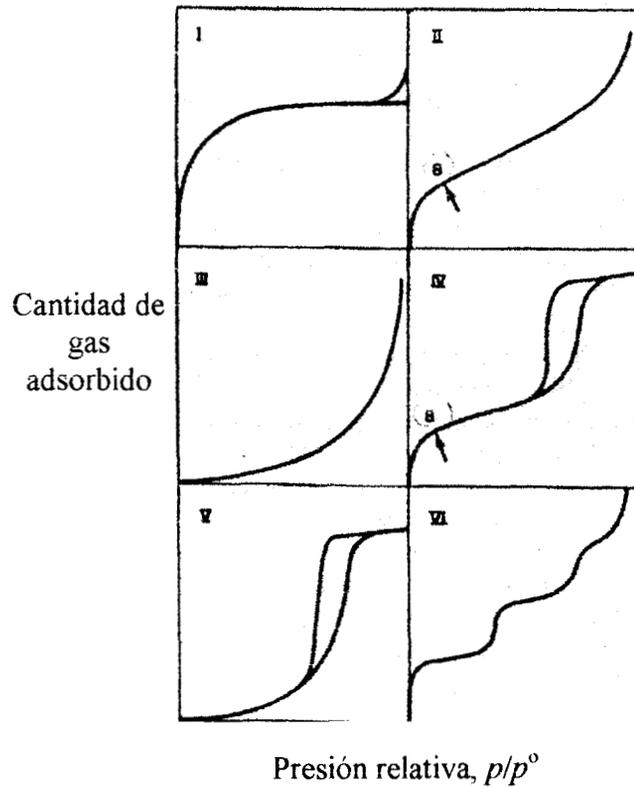


Figura III.1. Los cinco tipos de isothermas de adsorción, I a V, según la clasificación BET, junto con la isoterma tipo VI, de pendiente escarpada.

Actualmente se cuenta con equipos que hacen pasar nitrógeno líquido a 77°K ; dado que a esa temperatura el nitrógeno es líquido éste se condensa en los poros del sólido que se está analizando formando una monocapa. En base a la cantidad de moles que quedan adsorbidos es posible conocer el área superficial del sólido que se está analizando (el área molecular del nitrógeno es de 16.2 \AA).

Adicionalmente estos equipos construyen curvas de distribución de poros empleando como base la ecuación de Kelvin y conociendo el radio molecular del nitrógeno (2.27\AA):

$$\ln (p/p_o) = -[(2\gamma V_L)/(RT)] [1/r_m]$$

Donde p/p_0 es la presión relativa de vapor en el equilibrio con un menisco que tiene una curvatura r_m , γ y V_L son respectivamente la tensión superficial y el volumen molar del nitrógeno adsorbido (Gregg y Sing, 1982).

En los análisis tanto de suelos como de xerogeles del presente trabajo, se encontraron siempre isothermas de tipo IV. Las isothermas de este tipo son frecuentes en xerogeles de óxidos inorgánicos cuya estructura es mesoporosa, así que no es sorprendente que se presenten en estos xerogeles de sílice.

Cabe recordar que los poros se clasifican como sigue:

	Diámetro
Microporos	Menos de 20 Å
Mesoporos	Entre 20 y 500 Å (2 – 50 nm)
Macroporos	Más de 500 Å (50 nm)

Así que en los sistemas estudiados en el presente trabajo donde el tamaño promedio de poros fue de 30 a 90 Å, se trata de sólidos mesoporosos.

Artículo:

"SiO₂ Xerogel: A Suitable Inert Support for Microbial Growth"

M.R. Peralta-Pérez, G. Saucedo-Castañeda, M. Gutiérrez-Rojas y A. Campero.

J. Sol-Gel Sci. and Technol. 20 : 105-110, 2001.



SiO₂ Xerogel: A Suitable Inert Support for Microbial Growth

M.R. PERALTA-PEREZ, G. SAUCEDO-CASTAÑEDA AND M. GUTIERREZ-ROJAS
*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa,
Av. Michoacán y la Purísima s/n Col. Vicentina C.P. 09340, México D.F. México*

A. CAMPERO*
*Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa,
Av. Michoacán y la Purísima s/n Col. Vicentina C.P. 09340, México D.F. México*

acc35@xanum.uam.mx

Abstract. A silica xerogel was prepared at pH 2 by the hydrolysis-condensation reactions of the sol-gel method. Silica xerogel was used as a support for the growth of two filamentous fungi: *Aspergillus niger* ATCC 9642 and *Phanerochaete chrysosporium* A594. In both cases, an apparent abundant mycelia growth (5.5 mg biomass/g dry xerogel and 4.7 mg biomass/g dry xerogel respectively) was observed. A phase of rapid consumption of glucose which lasted until 96 h of culture with sugar consumption rate of 0.075 mg sugar/g support h and 0.042 mg sugar/g support h respectively, was also observed. Scanning electron microscopy (SEM) showed a superficial colonisation of both strains even in the occasional imperfections and crevices of the xerogel. This novel application of sol-gel metallic oxide systems suggests the potential use of an inert and versatile support which could be valuable, for example for solid state fermentation fundamental studies.

Keywords: filamentous fungi, microbial growth, SiO₂ xerogel, solid state fermentation

Introduction

Sol-gel chemistry, based on inorganic polymerisation reactions, has been applied to different research areas for several years. Because of the soft chemical conditions in which these reactions take place, the method has been used successfully since the early nineties in different biological systems such as protein encapsulation [1, 2], live cell encapsulation [3–5], and immunoassays [6]. The main characteristics of sol-gel materials for biological applications are: i) preserve bioactivity of labile organic structures within the porous matrix; ii) allow free diffusion of the substrate to the enzyme or the nutrients to the encapsulated live cells; and iii) allow the elimination of waste products due to their fine porous structure. These dynamic systems can be reused resulting in practical applications, for instance encapsulation

of *Pseudomonas* cells to be used for atrazine (herbicide) biodegradation [7].

A possibility which has not yet been explored is the use of sol-gel systems as supports for the microbial growth in the so-called solid state fermentation (SSF), which refers to the treatment of a wet material not suspended in water allowing the development of microbial culture [8]. SSF has been widely used for physiological studies and in the production of some metabolites, for example, citric acid by using complex natural materials such as sugar cane [9] and apple pomace [10] as supports. Due to their composition (sugars, salt content, etc.) natural supports of this kind are disadvantageous since they influence the microbial growth complicating SSF basic studies.

For this reason, it has been proposed lately the use of inert materials, able to retain water and nutrients as simple study models. Some examples are amberlite [11] and polyurethane foam [12]. A porous xerogel made

*To whom all correspondence should be addressed.

of SiO₂ could be an interesting option for this purpose: its microporous matrix would allow water retention as well as nutrient flux, and because of its innocuous nature it does not interfere with microbial metabolism [13].

The aim of this work was to demonstrate the application of a SiO₂ xerogel as a suitable support for the superficial growth of filamentous fungi.

Results and Discussion

Under vigorous mechanical agitation, a mixture of TEOS and water with a molar ratio of (1 : 10) was prepared. The pH of the mixture was taken to a value of 2 by adding a 0.1 M HCl solution. Polymerisation took place and its rate was increased by heating up to 60°C. The increase of temperature also favoured gel ageing and the elimination of ethanol formed as a reaction product, which could be toxic to the microorganisms. After 24 h the result was a white xerogel which was stirred and the fraction between meshes 8 and 30 was kept. This fraction was washed with water (1 : 10 w/v) and dried in a stove at 60°C to eliminate any residue of toxic ethanol.

The xerogel texture was determined by N₂ gas absorption, using an ASAP-2000 instrument. The xerogel obtained had a specific surface area of 759 m²/g and an average pore size of 30.0 Å. Figure 1 shows a micrograph of a xerogel fragment used as a support. It is seen that the internal surface is wrinkled and though no pores larger than 30.0 Å are seen, a large crack is detected

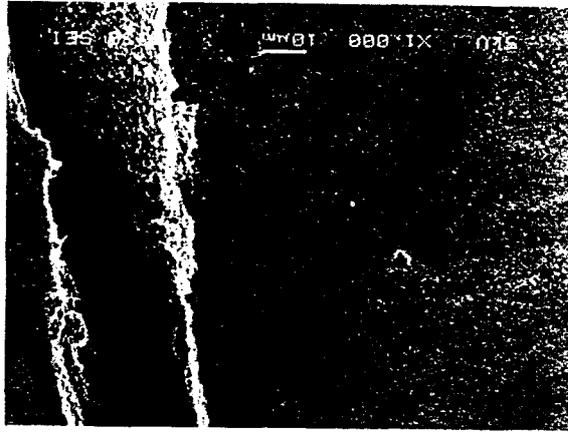


Figure 1. Scanning electron microscopy of SiO₂ glass using an inert support (original magnification 1000×). A large crack between two separate gel fragments can be seen.

between two separate fragments of the gel, where the water retention capacity, normally about 40–50%, was weighted again. The increment in weight was the 15 min. After excess water was decanted, the sample (24 h), was immersed in 20 ml of distilled water for a sample of one g of xerogel, previously dried at 60°C fungus can grow using the internal walls preferentially.

7.2 grams of the xerogel obtained were placed into six 160 ml serologic bottles. It was then impregnated with 6 ml of culture medium two times more concentrated than that used by Sutherland et al. [14]. The bottles were hermetically closed to avoid drying of the support. The fungi used in this study were the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* A594, deuteromycete *Aspergillus niger* ATCC 9642 and the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* A594. Both fungi were propagated in agar plates for five days. The spores obtained were collected with Tween 80 (0.01%) and used for inoculation (8.46×10^6 spores/g xerogel). Every 24 h wet air was injected into the bottles in order to change the atmosphere and maintain an appropriate level of O₂. Every 24 to 48 h three bottles of each fungus were collected to perform the corresponding analysis. For the analysis 10 ml of water were added to 1 g of xerogel, the mixture was then shaken for 10 min, the supernatant obtained was used to measure pH, and reducing sugars by means of dinitrosalicylic acid [15].

Figure 2 shows the evolution of pH during the fermentation time. It is observed that up to 96 h of fermentation the pH remains practically constant in the case of *P. chrysosporium*, while for *A. niger* the pH slightly diminishes (almost 0.5 pH units). This typical *A. niger* behaviour is attributable to the microbial metabolism. *A. niger* characteristically produces organic acids, which explains the slight diminution of pH [16]. At the end of fermentation the pH slightly increases, probably due to natural cellular lysis. Since *P. chrysosporium* does not produce organic acids we did not expect any change in pH.

These typical pH behaviours are indicative that the microorganisms are growing on the support, which is confirmed when observing the significant diminution of reducing sugars in the medium as a consequence of their consumption to maintain the vital functions of microorganisms.

Figure 3 shows the reducing sugar consumption for both fungi. In both cases sugar consumption begins rapidly (around 12 h of fermentation). By the end of culture *A. niger* consumed 91.6% of initial sugar at a rate of 0.075 mg sugar/g support h, while in the same

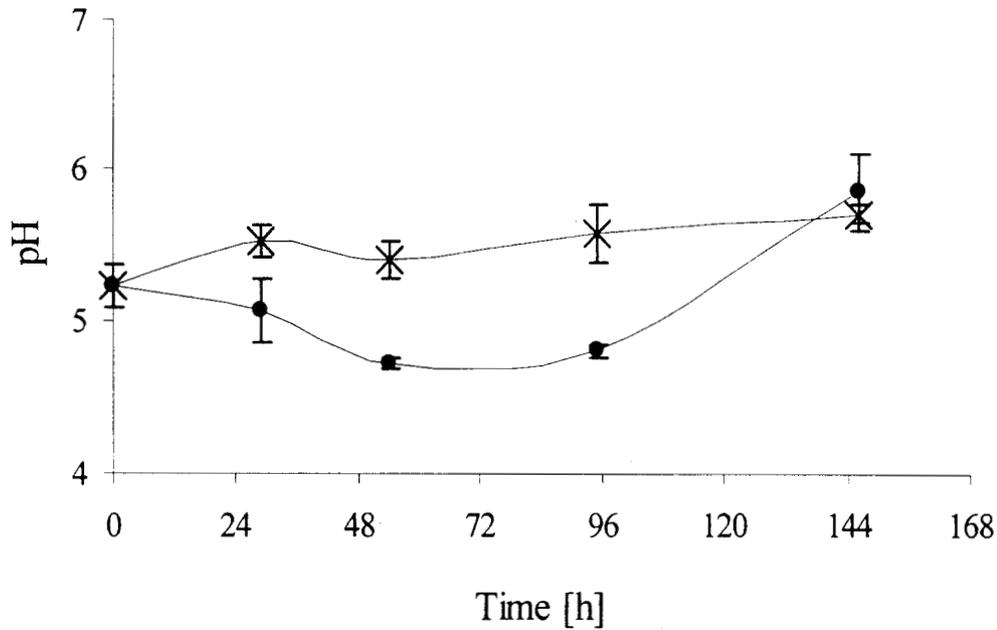


Figure 2. pH evolution during fermentation. * *P. chrysosporium* A594, ● *A. niger* ATCC9642.

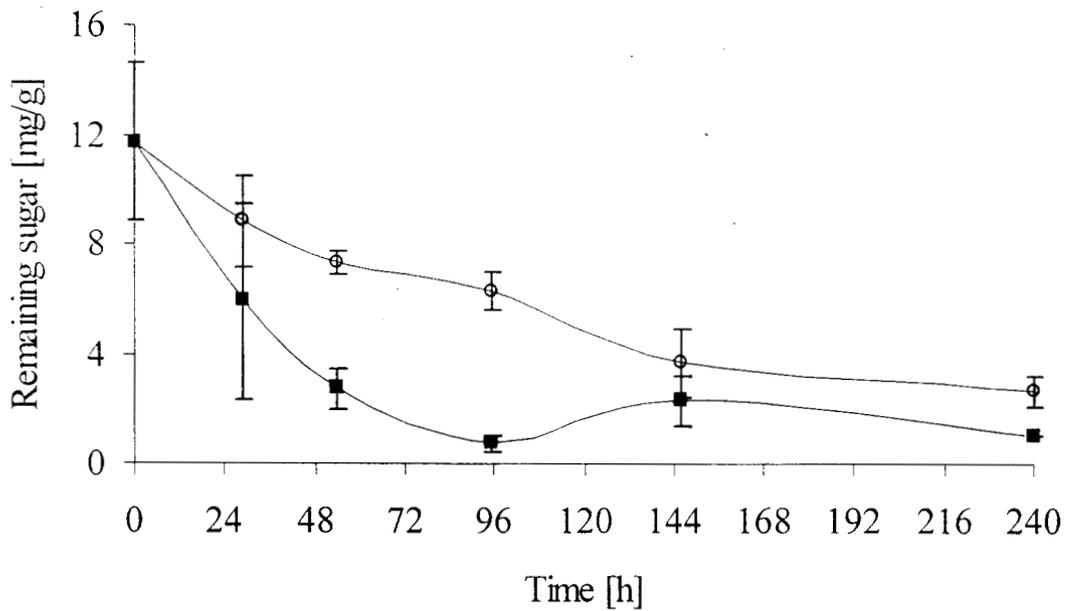


Figure 3. Reducing sugar concentration during fermentation. ○ *P. chrysosporium* A594, ■ *A. niger* ATCC9642.

time *P. chrysosporium* consumed only 77.6% at an average rate of 0.042 mg sugar/g support h. This fact reflects metabolic differences between the two microorganisms.

Comparison of sugar consumption rates with previous reports is difficult, since the initial sugar

concentration reported in them is up to 10 times greater than the one used in our case. However concerning total sugar consumption, our results are substantially better than in previous works [10, 11], where values of only 50–70% are reported, while in our case both fungi were capable of consuming 78–91% of the initial sugar

in the medium. These results show that SiO₂ xerogel provides an adequate support for microbial growth and that it does not inhibit substrate consumption.

Scanning electron microscopy was used to study the colonisation of the xerogel by both fungi. Dehydrated SiO₂ samples with fungi superficial colonisation were metalized with gold (three discharges of 40 mA/50 s each one, argon atmosphere), in high vacuum metalizer (Bal-Tec SCD 050). The samples were analyzed in a scanning electron microscope (JSM-500 LV), using secondary electrons, with an acceleration voltage of 5 kV and work distance between 11–13 mm.

Figure 4 shows the growth of *A. niger* at different times (4(A) 29 h, 1000×; 4(B) 146 h, 160×; 4(C) 146 h, 1000×). In three cases the growth took place on the surface of the xerogel and on the large crevices or cracks originated by fracture of the xerogel, whose internal walls are clearly suitable for colonisation. The typical width of the hyphae was approximately 3 μm, and that of the sporangium observed in Fig. 4(B) was of 16 μm. This hypha size agrees with reports for *A. niger* in superficial cultures at high glucose levels [17].

Figure 5 shows two different stages of the growth of *P. chrysosporium*. Figure 5(A) shows that the complex mycelial net which develops on a support is apparently made by abundant mycelium of approximately 3 μm width. Theoretical biomass production, considering that biomass yield was 0.5 mg biomass/g sugar, was 5.5 mg biomass/g dry xerogel for *A. niger* and 4.7 mg biomass/g dry xerogel for *P. chrysosporium*. This is 10 times lower than as reported by other authors [12, 18, 19], yet our initial sugar concentration was also 10 times lower than that used by them.

After 146 h of growth (Fig. 5(B) and (C)), SEM micrographs of *P. chrysosporium* show the presence of an exocellular polymer which surrounds the mycelium. In fungus natural environments, the function of the polymer is to covalently wrap the wood to start its depolymerisation [20]. This exocellular polymer apparently has an important role in the wood depolymerizing enzymes transport [21, 22]. The occurrence of the structures previously observed in this fungus on a natural substrate, confirms that using our silica xerogel as a support allows the study of this kind of microorganisms, with the great advantage of using a well defined medium which enables the study and analysis without interference. Thus, SiO₂ xerogels show a great potential as supports for microbial growth. Furthermore, their use provides an improved understanding of the phenomena involved during SSF.

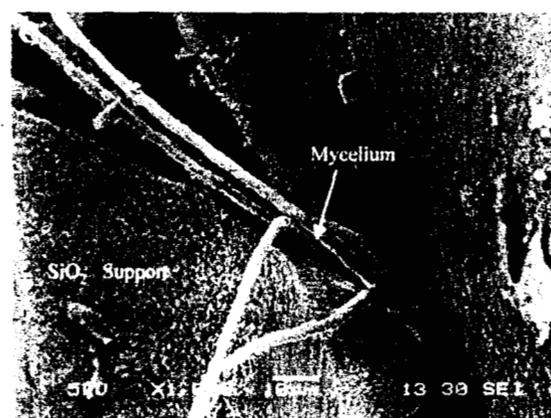


Figure 4. Scanning electron microscopy of *A. niger* ATCC9642 mycelium growing on xerogel at different fermentation time; (A) 29 h (original magnification 1000×); (B) 146 h (original magnification 160×); (C) 146 h (original magnification 1000×).

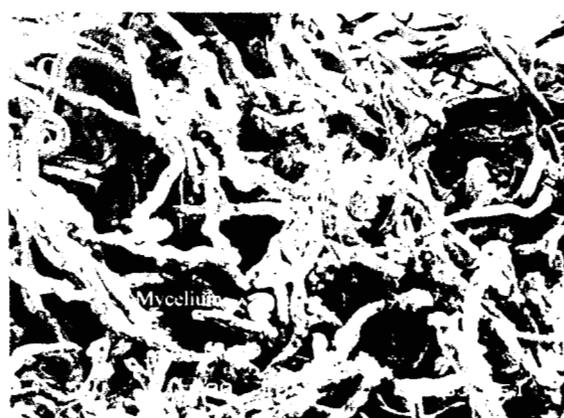
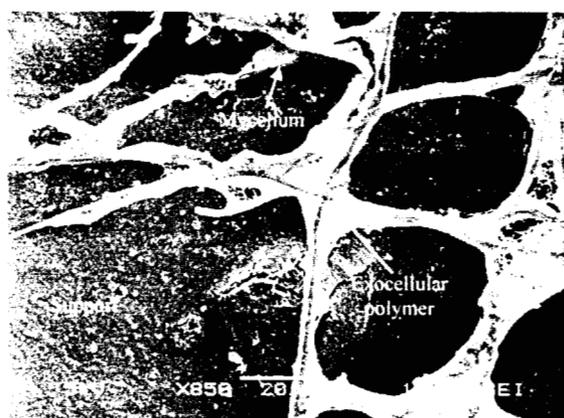
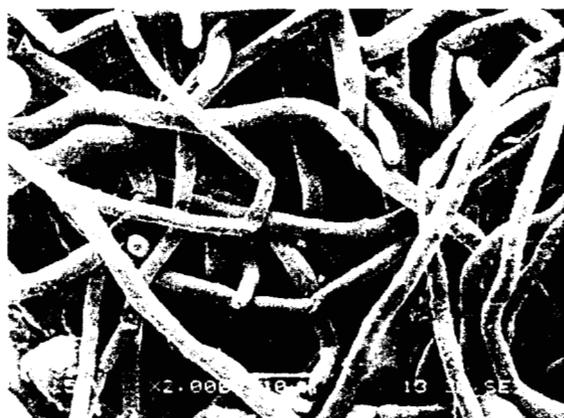


Figure 5. Scanning electron microscopy of *P. chrysosporium* A594 mycelium growing on xerogel at different fermentation time; (A) 29 h (original magnification 2000 \times); (B) 146 h (original magnification 850 \times); (C) 146 h (original magnification 1000 \times).

Conclusions

The use of SiO₂ xerogels as appropriate supports for physiological and biochemical studies of filamentous fungi has been proved to be possible. The innocuous nature and high porosity of these gels allow the growth of fungi by enhancing water retention and nutrient diffusion.

A short lag phase and a quick exponential growth phase was observed. Furthermore, an extracellular polymer produced by *P. chrysosporium* was detected in the final stages of growth, when nutrients in the medium were depleted, which is often related to the synthesis and transport of exocellular enzymes capable of depolymerizing wood, its natural substrate. These observations show that by using SiO₂ xerogel there are no interferences either with the growth of microorganisms or metabolite transport.

Acknowledgments

Research supported in part by grants: IMP FIES-96-48-VI from Instituto Mexicano del Petróleo; and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 90855/114822. The authors are also indebted to Dr. José David Sepúlveda Sánchez for SEM micrographs.

References

1. S. Braun, S. Shtelzer, S. Rappoport, D. Avnir, and M. Ottolenghi, *J. Non-Cryst. Solids* **148**, 739–743 (1992).
2. L.M. Ellerby, C.R. Nishida, F. Nishida, A.Y. Stacey, B. Dunn, J.S. Valentine, and J.I. Zink, *Science* **255**, 1113–1115 (1992).
3. J. Livage, J.Y. Barreau, J.M. Da Costa, and I. Desportes, *Sol-Gel Optics III* **2288**, 493–503 (1994).
4. E.J.A. Pope, *Journal of Sol-Gel Science and Tech.* **4**, 225–229 (1995).
5. R. Campostrini, G. Carturan, R. Caniato, A. Piovan, R. Filippini, G. Innocenti, and E.M. Cappelletti, *Journal of Sol-Gel Science and Tech.* **7**, 87–97 (1996).
6. J. Livage, C. Roux, J.M. Da Costa, I. Desportes, and J.F. Quinson, *Journal of Sol-Gel Science and Tech.* **7**, 45–51 (1996).
7. M. Rietti-Shati, D. Ronen, and R.T. Mandelbaum, *Journal of Sol-Gel Science and Tech.* **7**, 77–79 (1996).
8. G. Viniegra-González, in *Advances in Solid State Fermentation*, edited by S. Roussos, B.K. Lonsane, M. Rainmbault, and G. Viniegra-González (Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1997), pp. 7–10.
9. K. Lakshminarayana, K. Chaudhary, S. Ethiraj, and P. Tauro, *Biotech. Bioeng.* **17**, 291–293 (1975).

10. Y.D. Hang and E.E. Woodams, *Biotech. Letters* **9**, 183–186 (1987).
11. M. Gutiérrez-Rojas, J. Córdova, R. Auria, S. Revah, and E. Favela-Torres, *Biotech. Letters* **17**, 219–224 (1995).
12. Y. Zhu, J.P. Smits, W. Knol, and J. Bol Tno, *Biotech. Letters* **16**, 643–648 (1994).
13. E.J.A. Pope, K. Braun, and C.M. Peterson, *Journal of Sol-Gel Science and Tech.* **8**, 635–639 (1997).
14. J.B. Sutherland, A.L. Selby, J.P. Freeman, F.E. Evans, and C.E. Cerniglia, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3310–3316 (1991).
15. G.L. Miller, *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959).
16. B. Atkinson and F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook* (Macmillan Publisher Ltd., Great Britain, 1991), pp. 1173–1176.
17. C.P. Larralde-Corona, F. López-Isunza, and G. Vinięra-González, *Biotech. Bioeng.* **56**, 287–294 (1997).
18. J. Córdova-López, M. Gutiérrez-Rojas, S. Huerta, G. Saucedo-Castañeda, and E. Favela-Torres, *Biotechnol. Techniques* **10**, 1–6 (1996).
19. R. Auria, S. Hernández, M. Raimbault, and S. Revah, *Biotechnol. Techniques* **4**, 391–396 (1990).
20. O. Milstein, R. Gersonde, A. Huttermann, M. Chen, and J.J. Meister, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3225–3232 (1992).
21. J.G. Palmer, L. Murmanis, and T.L. Highley, *Mycologia.* **75**, 1005–1009 (1983).
22. K. Ruel and J.P. Joseleau, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 374–384 (1991).