



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

*ESTUDIO DE LA DEGRADACION DE
PENTACLOROFENOL POR *Rhizopus nigricans*
EN CULTIVO SUMERGIDO Y SOLIDO.*

T E S I S

Para obtener el Grado de
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA.

p r e s e n t a

DIANA VERONICA CORTES ESPINOSA

Ingeniero Bioquímico Industrial

Egresado de la Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

México, D.F.
Mayo, 2000.

“El posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
esta incluido en el patrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y
además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio
471-0/Maestría en Biotecnología.”

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la comunicación de resultados que presentó:

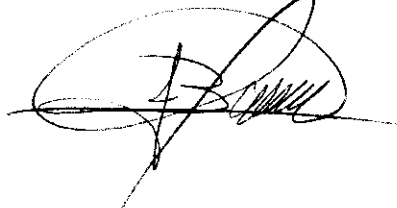
Diana Verónica Cortés Espinosa.

El día 31 de mayo del año 2000

Comité tutorial:

Tutor: Dra. Araceli Tomasini Campocosío.

Asesor: Dr. Javier Barrios González.



Sinodal: Dra. Susana Saval Bohorquez



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Metabolitos Secundarios del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Araceli Tomasini Campocosio, el Dr. Javier Barrios González y gracias al apoyo económico, convenio número 25703-B brindado por CONACyT.

A ti amor:

Porque eres mi Angel,
por toda la comprensión,
confianza y apoyo incondicional
que me has brindado para
realizar una de tantas
metas que me he propuesto
alcanzar a tu lado y desde
el momento en que nos unimos.

Por la gran seguridad
que me da tu amor
para seguir adelante
sin miedo de caer
porque sé que tu estarás a
ahí cuando esto suceda.

TE AMO

DIANA.

A mis padres:

Por todo el amor que me han brindado, consejos y apoyo para realizar todas mis inquietudes y porque con su ejemplo me han motivado a seguir adelante.

Gracias por darme la vida y por mostrármela cuando era pequeña de la manera más bella y llena de fantasías.

A mis hermanos:

Claudia, Mario, Miguel y Toño porque siempre han estado conmigo cuando más los he necesitado y porque se que en todo momento cuento con ellos incondicionalmente. Gracias por ser mis hermanos, mis padres no pudieron hacerme mejor regalo que tenerlos a todos ustedes a mi lado.

A mis abuelos:

A los que ya no están conmigo :

Por enseñarme que la familia es lo más importante y valioso en la vida. Gracias a los dos por darme a la persona que más he querido en mi vida, mi Mamá. Gracias abuelito por enseñarme a compartir todo lo que tengo con los demás.

A los que todavía tengo:

Por enseñarme a ser fuerte y no doblegarme ante nadie ni ante nada, por darme este gran orgullo para salir adelante y gracias a estas enseñanzas estoy donde estor y principalmente gracias por darme al mejor de sus hijos, mi Padre.

A mis tíos y tías :

Juan, Chivis, Eli, Martha, Chayo, Rey, Miguel, Chema, Bernardo:
Porque gracias a cada uno de sus consejos y oraciones que me han dado hoy estoy aquí escribiendo estas líneas con mucha tranquilidad.

A mis primos:

Por darme la mejor de las infancias, porque crecieron conmigo compartiendo amistad, compañía, locuras, diversión y lo más importante unión.

A mis amigas:

Marisol, Rosy, Lupita y Lili porque han estado conmigo desde los momentos más bellos de mi vida: Mi juventud. Siempre me acuerdo de ustedes duendecillas traviesas.

A Vero Flores:

Por darme tu amistad y enseñarme tantas cosas. Gracias por compartir conmigo la etapa más bonita de tu vida. Ser mamá.

A cada uno de mis amigos:

Porque en algún momento de mi vida me han hecho pasar momentos muy padres e inolvidables.

A todos los que en este momento no recuerdo y que han puesto un granito de arena en mi vida para seguir adelante. Gracias

Agradezco de forma especial a todos los compañeros del laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Molecular de la UAM-I, especialmente a la Dra. Araceli Tomasini C. por brindarme toda su confianza y apoyo para desempeñar mi trabajo dentro de este grupo. Por toda su ayuda. GRACIAS.

DIANA

INDICE GENERAL

| | Pag. |
|--|------|
| Indice general | I |
| Indice de tablas | V |
| Indice de figuras | VI |
| Lista de abreviaturas | VIII |
| I. RESUMEN | IX |
| II. INTRODUCCION | 1 |
| 2.1 Aspectos generales del pentaclorofenol | 1 |
| 2.1.1 Características fisicoquímicas del pentaclorofenol | 1 |
| 2.1.2 Usos del pentaclorofenol | 1 |
| 2.1.3 Toxicidad | 4 |
| 2.1.3.1 En organismos acuáticos | 5 |
| 2.1.3.2 En animales | 5 |
| 2.1.3.3 En humanos | 6 |
| 2.1.3.4 En el medio ambiente | 6 |
| 2.1.4 Mecanismo de acción | 7 |
| 2.1.5 Degradación del pentaclorofenol | 8 |
| 2.1.5.1 Fotodegradación | 8 |
| 2.1.5.2 Volatilización | 8 |
| 2.1.5.3 Biodegradación | 8 |
| 2.1.5.3.1 Degradación por bacterias | 11 |
| 2.1.5.3.2 Degradación por hongos filamentosos..... | 13 |
| 2.1.5.3.3 Bioquímica de la degradación..... | 14 |
| 2.2 Aspectos generales de <i>Rhizopus nigricans</i> | 17 |
| 2.2.1 Características de <i>R. nigricans</i> | 17 |
| 2.3 Cultivo en medio sólido | 19 |
| 2.3.1 Características del sistema de fermentación sólida | 19 |
| 2.3.2 Ventajas y desventajas | 19 |
| III. ANTECEDENTES | 21 |
| IV. JUSTIFICACION | 23 |
| V. HIPOTESIS | 25 |
| VI. OBJETIVO GENERAL | 25 |

| | |
|---|----|
| VII. OBJETIVOS PARTICULARES | 25 |
| VIII. MATERIAL Y METODOS | 26 |
| 8.1 Microorganismo | 26 |
| 8.2 Medios de cultivo | 27 |
| 8.2.1 Medios de esporulación y conservación de <i>R. nigricans</i> | 27 |
| 8.2.2 Cultivo sumergido | 27 |
| 8.2.3 Sistema de fermentación sólida | 27 |
| 8.2.4 Pruebas cualitativas de enzimas | 27 |
| 8.3 Conservación de las cepas | 28 |
| 8.4 Esporulación | 29 |
| 8.5 Condiciones de cultivo | 30 |
| 8.5.1 Cultivo sumergido | 31 |
| 8.5.1.1 Diseño factorial | 31 |
| 8.5.1.2 Actividad enzimática (LiP) | 32 |
| 8.5.1.3 Cultivo con tirosina | 32 |
| 8.5.2 Cultivo superficial | 33 |
| 8.5.3 Fermentación sólida | 34 |
| 8.5.3.1 Pretratamiento del soporte | 34 |
| 8.5.3.2 Preparación del SFS | 34 |
| 8.6 Técnicas analíticas | 37 |
| 8.6.1 Cultivo sumergido | 37 |
| 8.6.1.1 Biomasa | 37 |
| 8.6.1.2 pH | 37 |
| 8.6.1.3 Extracción de pentaclorofenol | 37 |
| 8.6.1.4 Cuantificación del pentaclorofenol | 38 |
| 8.6.1.5 Actividad enzimática de LiP | 38 |
| 8.6.2 Fermentación sólida | 39 |
| 8.6.2.1 pH | 39 |
| 8.6.2.2 Humedad | 39 |
| 8.6.2.3 Evolución del CO ₂ | 39 |
| 8.6.2.4 Extracción del PCF..... | 39 |
| 8.6.2.5 Cuantificación del pentaclorofenol residual | 40 |
| 8.6.2.6 Germinación de esporas..... | 40 |
| IX. RESULTADOS Y DISCUSION | 41 |
| 9.1 Determinación de las condiciones de cultivo sumergido para la mayor degradación de PCF por <i>R. nigricans</i> | 41 |
| 9.1.1 Análisis estadístico del diseño factorial | 41 |

| | |
|--|----|
| 9.2 Identificación de la(s) enzima(s) que intervienen en la degradación del PCF en cultivo sumergido por <i>R. nigricans</i> | 46 |
| 9.2.1 Pruebas cualitativas para determinar la presencia de peroxidasas y fenoloxidasas producidas por <i>R. nigricans</i> .. | 46 |
| 9.2.2 Cuantificación de la actividad enzimática de LiP en cultivo sumergido con PCF de <i>R. nigricans</i> | 50 |
| 9.2.3 Degradación del PCF por <i>R. nigricans</i> en cultivo sumergido con tirosina..... | 52 |
| 9.3 Determinación de la capacidad de degradación del PCF por <i>R. nigricans</i> en SFS | 58 |
| 9.3.1 Germinación de las esporas de <i>R. nigricans</i> en SFS con PCF | 58 |
| 9.3.2 Estandarización de la técnica de extracción del PCF residual del bagacillo de caña en SFS | 60 |
| 9.3.3 Selección de la concentración del medio de cultivo para el crecimiento de <i>R. nigricans</i> en SFS | 61 |
| 9.3.4 Cinética de degradación del PCF por <i>R. nigricans</i> en SFS con medio Melin-Norkrans (2x) y 12.5 ppm de PCF | 65 |
| 9.3.4.1 Evolución del CO ₂ durante el cultivo de <i>R. nigricans</i> en SFS | 65 |
| 9.3.4.2 Degradación del PCF en SFS por <i>R. nigricans</i> | 67 |
| 9.3.4.3 Monitoreo de pH y Humedad en SFS por <i>R. nigricans</i> | 68 |
| 9.4 Determinación de la máxima tolerancia al PCF por <i>R. nigricans</i> en SFS | 69 |
| 9.4.1 Actividad metabólica de <i>R. nigricans</i> utilizando 25 ppm de PCF de concentración inicial en SFS | 70 |

| | |
|--|----|
| 9.4.2 Actividad metabólica de <i>R. nigricans</i> utilizando 50 ppm de PCF de concentración inicial en SFS | 72 |
| 9.4.3 Actividad metabólica de <i>R. nigricans</i> utilizando 100 ppm de PCF de concentración inicial en SFS | 73 |
| X. CONCLUSIONES..... | 78 |
| XI. PERSPECTIVAS..... | 80 |
| XII REFERENCIAS..... | 82 |
| XIII. APENDICE | 89 |

INDICE DE TABLAS

| | Pag. |
|--|------|
| Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas del pentaclorofenol..... | 2 |
| Tabla 2. Microorganismos capaces de degradar PCF..... | 11 |
| Tabla 3. Resultados obtenidos de un diseño factorial por el programa estadístico SPSS para determinar el efecto que tienen los diferentes factores sobre la degradación del PCF por <i>R. nigricans</i> | 42 |
| Tabla 4. Estimación de medias por el programa estadístico SPSS para obtener el mayor porcentaje de degradación de PCF por <i>R. nigricans</i> | 43 |
| Tabla 5. Resultados de pH y biomasa del diseño factorial a las 48 y 140 h de cultivo sumergido con PCF (12.5 ppm inicial) inoculado con <i>R. nigricans</i> | 45 |
| Tabla 6. Actividad relativa de fenoloxidasas extracelulares en medio sólido producidas por <i>R. nigricans</i> | 48 |
| Tabla 7. Actividad enzimática de LiP en extractos de cultivo sumergido de <i>R. nigricans</i> con PCF (12.5 ppm) | 50 |
| Tabla 8. Resultados de biomasa y degradación de PCF a las 168 h de un cultivo sumergido de <i>R. nigricans</i> con 4 concentraciones diferentes de tirosina y PCF (12.5 ppm adicionado a las 48h de iniciado el cultivo)..... | 57 |
| Tabla 9. Resultados de cultivo sólido con <i>R. nigricans</i> a las 96 h de iniciado el cultivo con diferentes concentraciones de medio Melin Norkrans y 12.5 ppm de PCF..... | 64 |

INDICE DE FIGURAS

| | Pag. |
|---|------|
| Figura 1. Rutas propuestas de degradación microbiana del PCF | 10 |
| Figura 2. Mecanismo de degradación del PCF por bacterias propuesto por varios autores | 12 |
| Figura 3 Ciclo catalítico de las peroxidases | 15 |
| Figura 4. ciclo de vida de un Zygomycete típico | 18 |
| Figura 5 Micrografía electrónica de barrido a 300x de micelio de <i>R. nigricans</i> cultivado por 48 h..... | 18 |
| Figura 6. Diseño factorial de 4 factores con 2 niveles cada uno. Relación C/N, pH, temperatura y agitación. 16 tratamientos distintos con 2 repeticiones cada uno..... | 31 |
| Figura 7. Sistema de Fermentación sólida (SFS) con bagacillo de caña como soporte..... | 36 |
| Figura 8. Placas con medio Melin-Norkrans inoculadas con <i>R. nigricans</i> para pruebas cualitativas utilizando como sustratos para las enzimas al p-cresol y ácido tánico | 49 |
| Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>R. nigricans</i> en cultivo sumergido con PCF (12.5 ppm) y diferentes concentraciones de tirosina. | 54 |
| Figura 10. Disminución de PCF en cultivo sumergido con tirosina y PCF (12.5 ppm) por <i>R. nigricans</i> | 56 |
| Figura 11. Observaciones al microscopio a 400x de: a) Micelio de <i>R. nigricans</i> en SFS control sin PCF. b) Micelio de <i>R. nigricans</i> en SFS con PCF (12.5 ppm). Ambas tomadas a las 96h de cultivo usando bagazo de caña como soporte con medio Melin Norkrans concentrado (2x)..... | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Observaciones al microscopio a 400x de FS en bagacillo de caña impregnado con medio Melin-Norkrans concentrado 3 veces, incubados a 30°C. a) Sin PCF al tiempo inicial. b) con PCF a las 96 h y c) Sin PCF a las 96 h..... | 62 |
| Figura 13. Producción de CO ₂ durante el crecimiento de <i>R. nigricans</i> en SFS en bagacillo de caña con medio 2x y 12.5 ppm con un flujo de aire de 2.6 l/h e incubado a 30°C por 96 h..... | 66 |
| Figura 14. Disminución de la concentración de PCF en los extractos del bagazo de caña inoculado con <i>R. nigricans</i> y en los extractos del bagazo de los controles..... | 68 |
| Figura 15. Cambios registrados en el pH durante la cinética de degradación de PCF por <i>R. nigricans</i> en cultivo sólido..... | 69 |
| Figura 16. Producción de CO ₂ durante la cinética de degradación de PCF por <i>R. nigricans</i> en SFS utilizando bagacillo de caña con medio Melin-Norkrans y una concentración inicial de PCF de 25 ppm..... | 71 |
| Figura 17. Producción de CO ₂ durante la cinética de degradación de PCF por <i>R. nigricans</i> en SFS utilizando bagacillo de caña con medio Melin-Norkrans y una concentración inicial de PCF de 50 ppm | 72 |
| Figura 18. Producción de CO ₂ durante la cinética de degradación de PCF por <i>R. nigricans</i> en SFS utilizando bagacillo de caña con medio Melin-Norkrans y una concentración inicial de PCF de 100 ppm | 74 |
| Figura 19. Micrografías de microscopio óptico 400x del micelio de <i>R. nigricans</i> en SFS en bagazo de caña con medio Melin-Norkrans (2x). a) inóculo con PCF al tiempo inicial. b) inóculo sin PCF a las 96 h de cultivo. c) inóculo con 12.5 ppm de PCF.d) inóculo con 25 ppm. e) inóculo con 50 ppm. f) inóculo con 100 ppm | 76 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| α | nivel de significancia |
| col. | colaboradores |
| cm | centímetro/centímetros |
| C/N | relación carbono/nitrógeno |
| EMA | extracto de malta agar |
| esp. | esporas |
| ϵ | coeficiente de extinción molar |
| g | gramo/gramos |
| gMSI | gramos de materia seca inicial |
| h | hora/horas |
| HPLC | cromatografía líquida de alta resolución |
| Kg | kilogramo/kilogramos |
| L | litro/litros |
| lb/pulg ² | libras por pulgada cuadrada |
| LIP | lignina peroxidasa |
| m ³ | metros cúbicos |
| min | minuto/minutos |
| mg | miligramo/miligramos |
| mg X | miligramos de biomasa producida |
| ml | mililitro/mililitro |
| mm | milímetro/milímetros |
| mmol | milímol/milimoles |
| MN | medio Melin-Norkrans |
| MnP | manganeso peroxidasa |
| Ng | nanogramo/nanogramos |
| PCA | pentacloroanisol |
| PCF | pentaclorofenol |
| PDA | agar dextrosa y papa |
| Ppm | partes por millón |
| rpm | revoluciones por minuto |
| R _T | tiempo de retención |
| SFS | sistema de fermentación sólida |
| T | temperatura (°C) |
| Tir | tirosina |
| U | unidad enzimática |
| μ l | microlitros |
| μ g | microgramos |
| 2x | medio Melin-Norkrans concentrado dos veces |

I. RESUMEN

El PCF es un compuesto aromático, el cual es muy utilizado como un potente fungicida para la preservación y protección de la madera y sus derivados. En México el 30% de las aguas de desecho proviene de estas industrias, por lo que, este compuesto se puede encontrar en cantidades considerables en aguas residuales y suelos cercanos a estas industrias. Tiene una alta persistencia en el medio ambiente, una lenta biodegradación y presenta un efecto tóxico sobre muchos sistemas biológicos. Debido a esto es importante proponer procesos para su degradación y/o biorremediación. Entre los métodos convencionales utilizados para este fin se encuentran los químicos y biológicos. Los métodos biológicos han tomado mucha importancia en la actualidad, principalmente la degradación microbiana. Se han realizado estudios con diferentes microorganismos como bacterias y hongos filamentosos.

Entre los hongos capaces de degradar el PCF se encuentran algunos bacidiomicetes como *Phanerochaete chrysosporium* que degrada el 70% de PCF en 22 días usando una concentración inicial de 12 ppm, gracias a que posee un sistema enzimático altamente inespecífico. Sin embargo, para utilizar microorganismos en procesos biotecnológicos se necesitan cepas con tiempos cortos de crecimiento y altas tasas de degradación, por lo que es necesario encontrar otras especies que presenten estas características. En este grupo de investigación se aisló un hongo que se identificó como *Rhizopus nigricans*, un zigomiceto silvestre de crecimiento rápido, el cual tolera hasta 100 ppm en cultivo superficial y es capaz de degradar el 65% del PCF inicial en 5 días en cultivo sumergido. En este estudio se plantearon como objetivos determinar las condiciones de cultivo sumergido para la máxima degradación de PCF por *R. nigricans*, la identificación de la(s) enzima(s) que intervienen en dicha degradación y determinar la capacidad de degradación por este hongo en sistema de fermentación sólida (SFS) con la finalidad de proponer a este hongo como una nueva alternativa para procesos de biodegradación y/o biorremediación.

Las condiciones de cultivo sumergido para *R. nigricans* se eligieron por medio de un diseño factorial 4^2 utilizando como factores la relación C/N, temperatura, pH y agitación utilizando el medio Melin-Norkrans modificado y 12.5 ppm de PCF inicial. Las condiciones bajo las cuales se encontró la máxima degradación fueron: relación C/N= 18.9, pH 5.6, T=30°C y con una agitación de 125 rpm. Para el SFS se utilizó el medio Melin-Norkrans concentrado impregnado en bagacillo de caña, con una temperatura de 30°C, una humedad constante del 75% y un flujo de aire de 2.6 l/h. Se probaron diferentes concentraciones de PCF (12.5, 25, 50 y 100 ppm) para medir la degradación y la tolerancia del hongo al compuesto tóxico. *R. nigricans* es capaz de crecer y degradar el 86% del PCF inicial (12.5 ppm) en solo 96 h en SFS y tolera altas concentraciones de PCF ya que fue capaz de crecer y degradar hasta 100 ppm en este mismo sistema. La identificación de las enzimas involucradas en la degradación del PCF por *R. nigricans* se hizo de forma cualitativa en placas de agar utilizando algunos reactivos que sirven como sustrato a las enzimas secretadas por el hongo dando coloraciones que indican solamente la presencia de la(s) enzima(s). Se encontró que *R. nigricans* produce fenoloxidasas probablemente se trate de una tirosinasa la que esté llevando a cabo la reacción de degradación del PCF. *R. nigricans* produce una cantidad de LiP mínima comparada con la producida por *P. chrysosporium*

ABSTRACT

Pentachlorophenol (PCP) has been used widely as a wood preservative and pesticide. It is an aromatic, xenobiotic and recalcitrant compound, and it presents toxic effect for all forms of life. For these reasons PCP degradation is of great importance, biological methods have been used for this purpose. Different microorganisms had been studied as bacterial species and fungi. Fungi able to degrade PCP belong to bacidiomycetes such as *Phanerochaete chrysosporium* that degrade 70% of PCP in 22 days with initial concentration of 12 ppm, because its enzymatic system produced is highly unspecific. Some fungi differente from bacidiomycetes have been used also to degrade PCP. These strains show shorts time of grown and may be higher degradation rate than bacidiomycetes. In our laboratory was isolated one strain that was identified as *Rhizopus nigricans*. It is a wild zygomycete of rapid grown, tolerate 100 ppm of PCP in superficial culture and it is able to degrade 65% of PCP at initial concentration of 12.5 ppm, in 5 days in submerged culture.

This study was made with the purpose to use this strain as new alternative for biodegradation and/or biorremediation. Three objectives were proposed: a) cultures conditions to increased PCP degradation by *R. nigricans* in submerged culture were determined. b) enzymes involved in PCP degradation were identified. and c) the capacity of degradation by this fungi in solid system fermentation (SSF) were studied. Culture conditions for *R. nigricans* was chosen by factorial design 4^2 factors studied were C/N rate, temperature, pH and shaking. Media Melin-Norkrans and 12.5 ppm of initial PCP were used. The conditions which maxim degradation was found were: C/N rate =18.9, pH=5.6, T=30°C and shaking of 125 rpm. Extracellular enzymes involved in PCP degradation by *R. nigricans* was identified qualitatively. Plates of agar were used and reactives as substrate as extracellular enzymes were added. Reaction with substrate and enzyme gave a color, then coloration intensity was used to indicate the presence of enzyme(s). It was shown that *R. nigricans* produces phenoloxidasas and probably it is one tyrosinase. Also it was determined that LiP activity produced by *R. nigricans* was smaller than LiP activity produced by *P. chrysosporium*. SSF was performed using sugarcane bagasse pith as support. It was used concentrated Melin-Norkrans media, and 75% of moisture was used. These cultures were incubated at 30°C with a rate aeration of 2.6 l/h. Different concentrations of PCP (12.5, 25, 50 y 100 ppm) were proved for measure degradation and tolerance of the strain over toxic compound. It was shown that *R. nigricans* is able to grown and degrade 86% of initial PCP (12.5 ppm) in 96 h in SSF and it is able to tolerate high concentrations of PCP because, it was able to grown and degrade until 100 ppm in the same system.

II. INTRODUCCION

2.1. ASPECTOS GENERALES DEL PENTACLOROFENOL (PCF)

2.1.1. Características fisicoquímicas del pentaclorofenol

El pentaclorofenol (PCF) es un compuesto clorofenólico que no se encuentra en forma natural en el medio ambiente. En forma comercial se conoce como santofen 20, penclorol, penta y pentaclorofenol y su presentación son en forma de cristales incoloros, en polvo blancos, hojuelas de color gris oscuro o café. Presenta un fuerte olor fenólico sólo cuando es expuesto a altas temperaturas. Tiende a formar sales como el pentaclorofenato de sodio, en ésta forma es soluble en agua. En forma pura el PCF es insoluble en agua pero es muy soluble en alcoholes (metanol y etanol), éter y menos soluble en benceno y poco soluble en éter de petróleo frío (ATSDR, 1994). Las propiedades fisicoquímicas del pentaclorofenol se resumen en la Tabla 1.

El PCF fue sintetizado por primera vez por Erdmann a mediados del siglo XIV y se comenzó a producirse a escala industrial en 1936. Actualmente es fabricado por dos procesos, ya sea por cloración progresiva de fenoles en presencia de catalizadores o por hidrólisis de hexaclorobenceno. El producto comercial tiene impurezas como clorofenoles, dibenzofuranos policlorados, predioxinas, ciclohexenonas cloradas (Ahlborg y Thunberg, 1980; Gebefugi y col., 1979).

2.1.2. Usos del pentaclorofenol

El PCF fue introducido en 1936 como preservativo de la madera y más tarde como un desinfectante general ya que tiene una acción tóxica contra una gran diversidad de organismos. Actualmente el uso que se le da a nivel mundial, en

mayor o menor grado, es como plaguicida de amplio espectro e insecticida de la madera (termicida), preservativo para productos hechos de madera, fungicida en adhesivos, para textiles y hule; en la industria de producción de aceite mineral, control de lama en pulpa y papel, aditivos de pinturas, insecticida en la conservación de semillas, antioxidante del caucho, molucida y alguicida en las plantas hidroeléctricas (Freiter, 1979; Desmurs y Ratton, 1993).

Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas del pentaclorofenol

| PROPIEDADES | VALOR |
|---|---|
| Estado físico | Sólido cristalino (compuesto puro), perlas o polvo (producto comercial) |
| Olor | Fenólico muy fuerte a temperaturas altas |
| Color | Incoloro a blanco (compuesto puro), gris oscuro a café (producto comercial) |
| Punto de ebullición | 310°C (descomposición) |
| Peso molecular | 266.4 |
| Punto de fusión | 291°C |
| Densidad (d_4^{22} en g/ml) | 1.978 |
| Presión de vapor kPa (mmHg) | |
| a 20°C | 2×10^{-6} (1.5×10^{-5}) |
| a 19°C | 6.7×10^{-7} (5×10^{-6}) |
| Volatilidad (g/100 g vapor a 100°C y 750 mmHg) | 0.167 |
| Pka | 4.7 a 25°C |
| Constante de disociación | 5.5×10^{-6} a 25°C |
| Solubilidad en agua (g/l) | |
| 0°C, pH 5 | 0.005 |
| 20, pH 5 | 0.014 |
| 20°C, pH 7 | 2 |
| 20°C, pH 8 | 8 |
| 20°C, pH 10 | 15 |
| Solubilidad en solventes orgánicos (g/100 g) a 25°C | |
| acetona | 50 |
| benceno | 15 |
| etanol (95%) | 120 |
| isopropanol | 85 |
| metanol | 180 |

Adaptada de WHO, 1987.

También se ha utilizado para prevenir la formación de cieno y moho en cuartos de refrigeración y torres de enfriamiento; como aditivo en la elaboración de

pinturas, así como en la producción de jabones antibacteriales, productos de lavandería, medicamentos dérmicos y en la industria de cosméticos. En la agricultura ha sido empleado para asegurar la maduración y apertura de las cápsulas de algodón y como agente herbicida en cultivos de arroz, piña y caña de azúcar (Cserjesi, 1967; Gebefugi y col., 1979; Crosby y col., 1981).

En los E.U.A. entre el 95-98% de la producción de PCF es utilizado en la conservación de la madera, lo mismo que en Canadá. En Alemania, aproximadamente el 61% de la producción es usado en la conservación de la madera, un 13% en la industria textil, 5% en la industria de la piel, 6% en la industria del aceite mineral y 6% en la industria de pegamentos (WHO, 1987).

Actualmente debido a los problemas de contaminación que ha generado su empleo indiscriminado, la compra y uso del PCF se encuentran restringidos en varios países incluyendo EUA, Japón, Finlandia, Suiza y México. Por lo que, a raíz de dicha restricción su producción ha disminuido, teniendo acceso a él solamente aplicadores certificados que lo utilizan para conservar productos de madera prioritarios como postes de electricidad, cercas, durmientes de ferroviarios y pilotes de muelles, entre otros (ATSDR, 1994).

En México los usos permitidos para el PCF incluyen el agrícola, doméstico, urbano, industrial y para jardinería. Los nombres de los productos registrados para dichos fines son Pentalex S y Polacida L para la sal sódica y Pentamadera y Pentadragón 50 pino para el pentaclorofenol (CICOPLAFEST, 1992).

2.1.3. Toxicidad.

Existen numerosos estudios acerca de los efectos adversos que ocasiona el PCF en el medio ambiente, así como en la salud de animales incluyendo al hombre, ebido a la volatilidad que presenta se considera como una fuente importante de

contaminación ya que se ha detectado en el aire de áreas rurales en cantidades de 0.93 ng m^{-3} ; en áreas urbanas el nivel varía de 5.7 a 7.8 ng m^{-3} . En regiones donde se trata madera se han encontrado concentraciones elevadas de PCF en los sedimentos ($3\text{-}23 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$) y en la superficie de aguas residuales de $0.07\text{-}31.9 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$; en la tierra de estas mismas regiones se han detectado hasta $45.6 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ o más. Mientras que en muestras de tierra de regiones cercanas a las industrias productoras de PCF y pesticidas se han encontrado alrededor de $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (peso seco).

Dada la amplia distribución del PCF en el ambiente, la población en general está expuesta a él mediante tres vías principales: 1) por ingestión de agua o alimentos contaminados, 2) por contacto dérmico con agua o suelos contaminados y objetos de madera tratados y 3) por inhalación de vapores derivados de productos tratados (ATSRD, 1994).

Debido a su hidrofobicidad, el PCF puede ser absorbido por los pulmones, piel y tracto gastrointestinal después de una exposición por inhalación, dérmica u oral. Una vez dentro del cuerpo su distribución es limitada debido a su alta afinidad por las proteínas plasmáticas lo que impide su distribución. Los órganos principales en los que se almacena son el hígado, los riñones y el cerebro, y en menor proporción el bazo y el tejido adiposo. Así mismo puede conjugarse con el ácido palmítico y almacenarse temporalmente en el tejido graso. El metabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado y sus rutas más importantes son la conjugación con el ácido glucorónico y la dechloración oxidativa para formar tetraclorohidroquinona. La vía principal de eliminación es la orina. (Juhl y col., 1985).

2.1.3.1 En Organismos acuáticos.

El PCF es extremadamente tóxico para los organismos acuáticos. En el caso de las algas y plantas vasculares acuáticas puede destruir la clorofila, inhibir la fotosíntesis, alterar la actividad de ciertas enzimas, producir clorosis, alteraciones morfológicas o incluso la muerte. Los invertebrados y peces son muy sensibles al PCF. Los estudios de exposición al PCF en peces indican que la concentración capaz de causar la muerte es menor a 1 mg/l. Concentraciones subletales (1.8 μg de Na-PCF l^{-1}) causan reducción en el crecimiento. Una especie de pez tropical expuesta a concentraciones de 13.6-60.2 μg de PCF l^{-1} presentó una disminución en la actividad de las enzimas hepáticas, fosfatasa alcalina y succin-deshidrogenasa (WHO, 1987).

2.1.3.2. En Animales.

Sobre la toxicidad en animales se han hecho estudios con diferentes especies como ratas, conejos, ratones, cerdos, perros y monos (ATSDR, 1994; WHO, 1987). Se ha observado que el PCF es el más tóxico de los fenoles clorados ya que en experimentos realizados con ratas se presentaron efectos adversos en la reproducción, desarrollo de embriones, fetos y sobrevivencia neonatal en comparación con los otros clorofenoles (Schwetz y col., 1978). Otros efectos adversos que se han observado son disminución en el peso, descamación y pérdida de pelo, edema e inflamación de la piel, hipertrofia de los folículos pilosos, necrosis dérmica, aumento en el tamaño de los riñones, incremento en el peso relativo del hígado, necrosis y pigmentación hepática, daño vascular extenso, falla cardíaca, incremento en la incidencia de tumores y muerte (ATSDR, 1994). Es importante mencionar que la mayoría de los estudios en animales no se empleó PCF puro sino las marcas comerciales que contienen impurezas de otros compuestos tóxicos, por lo

que estos efectos tóxicos no solamente se pueden atribuir al PCF sino también a estas impurezas.

2.1.3.3 En Humanos.

En personas expuestas a PCF se ha descrito la presencia de sed muy intensa, congestión nasal, lagrimeo, debilidad, mareo, anorexia, náusea, vómito, anemia, diaforesis, pirexia, irritación de ojos, mucosas, urticaria crónica, dermatitis, quemaduras, ampollas y erupciones en la piel, cloroacné, daño corneal, inflamación del tracto respiratorio, bronquitis, elevación de la presión arterial, hiperglicemia, ictericia, taquicardia, sacudidas musculares, temblores, excitación, delirios intermitentes, confusión mental, disfunción renal, daño hepático, congestión, edema pulmonar, hemorragias intraalveolares, edema cerebral, convulsiones y muerte. En los humanos el PCF también causa desorden reproductivo, por ejemplo alteraciones menstruales en las mujeres, infertilidad y aumento en el número de abortos (ATSDR, 1994; WHO, 1987).

Aunque todos los trastornos antes mencionados se observaron en personas expuestas a PCF, los datos deben manejarse con reserva ya que en muchos de estos estudios no se especifica el nivel o la concentración de PCF a la cual estuvieron expuestas las personas, así mismo no se indica la duración de la exposición.

2.1.3.4 En el Medio ambiente.

La aplicación excesiva o inadecuada del PCF para combatir las especies como plagas, también puede afectar a muchos organismos que no son el blanco de acción. Entre ellos se pueden incluir a las poblaciones microbianas que son habitantes naturales de los suelos y cuya eliminación puede alterar los ciclos biogeoquímicos naturales de los elementos. Dicha aplicación puede reducir el

crecimiento tanto de bacterias como de hongos e inhibir la producción de CO₂, el consumo de oxígeno y la fijación de nitrógeno (Ishizawa y col., 1961; Tam y Trevors, 1981 a y b). Al parecer las bacterias Gram-negativas son menos sensibles al PCF gracias a los lipopolisacáridos de su pared celular que actúan como barrera y limita su entrada a las células (Izaki, 1981).

2.1.4. Mecanismo de acción.

La característica hidrofóbica que presenta el PCF le permite atravesar fácilmente la membrana plasmática y penetrar a las células. Existen evidencias de que el mecanismo tóxico de este compuesto se ejerce al desacoplar la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. En algunos experimentos se ha observado que el PCF se une a proteínas purificadas de mitocondrias de hígado de rata. Esta unión puede inducir cambios conformacionales en las enzimas involucradas en la fosforilación (Weinbach y Garbus, 1965). Otro sitio blanco importante para la acción tóxica del PCF es la membrana plasmática. Después de un tratamiento subletal con dicho compuesto se ha observado la desestabilización de la bicapa lipídica tanto de membranas purificadas como de células completas. Al parecer se presenta como resultado de una reducción del 50% en la fluidez de la membrana ocasionada por modificaciones en la estructura de la bicapa. También el PCF provoca otras alteraciones membranales como son la disminución en los niveles de ciertos fosfolípidos, cambios en la permeabilidad a los iones H⁺ y pérdida de la resistencia eléctrica (ATSDR, 1994).

2.1.5. Degradación del PCF.

Una vez que el PCF ha sido liberado en el medio ambiente puede sufrir una serie de procesos que poco a poco reducen su concentración y disminuyen las posibilidades de contacto con los organismos y las personas.

2.1.5.1 Fotodegradación.

La exposición del PCF a la luz solar en el aire y agua puede originar compuestos fenólicos con un menor número de átomos de cloro, sustancias hidroxiladas, dioxinas o compuestos alifáticos clorados los cuales presentan el mismo o mayor efecto tóxico. (Ahlborg, 1980; Crosby, 1981).

2.1.5.2 Volatilización.

La volatilización constituye otro mecanismo para disminuir los niveles de PCF, en suelos, aguas superficiales o productos de madera tratados pero es una fuente importante de contaminación del aire ya que se han encontrado cantidades de $0.93-7.8 \text{ ng m}^{-3}$. La forma no ionizada del PCF parece ser la única que puede volatilizarse, sobre este proceso influyen muchos factores como el pH, la temperatura, el disolvente empleado en la formulación, la humedad atmosférica, la adsorción a partículas y el contenido de agua y materia orgánica en los suelos (Kilser y col. 1979; Klopffer y col., 1982).

2.1.5.3 Biodegradación.

Los procesos abióticos antes mencionados contribuyen a reducir los niveles de PCF cuando se encuentra en el ambiente pero estas alternativas se han revelado como problemáticas (emisión de sustancias y subproductos peligrosos) ya que no

eliminan la contaminación en su totalidad y generalmente son costo elevado, sin embargo el mecanismo más relevante de eliminación de xenobióticos. Recientemente, se ha visto un creciente énfasis en tecnologías ambientalmente más benignas y efectivas basadas en la biodegradación (Edgington, 1994)

En degradación se utilizan los microorganismos aislados de lugares contaminados con estos compuestos, los cuales transforman o degradan los contaminantes, convirtiéndolos en especies químicas menos peligrosas o logrando su mineralización (Rawe y col., 1993).

La biodegradación puede llevarse acabo tanto en condiciones aerobias y anaerobias. En ambos casos se ha propuesto la metilación y la decloración como posibles rutas microbianas de transformación del PCF (Ahlborg, 1980). La decloración en condiciones anaerobias ocurre preferentemente por un mecanismo reductivo, sin embargo también pueden presentarse otras vías como la ruptura hidrolítica del enlace carbono-cloro o la decloración oxidativa en presencia del oxígeno (Schenk, 1989). Entre los productos obtenidos por biodegradación del PCF se han identificado compuestos fenólicos unidos a un número menor de átomos de cloro, clorhidroquinonas, clorobenzoquinonas y metil éteres de clorofenólicos. Esta serie de compuestos presentan una toxicidad variable, siendo en algunos casos mayor que la del PCF y en otros casos menor (Juhly y col., 1985; Ruckdeschel y col., 1986 y 1987). La formación de dichos productos se esquematiza en la figura 1.

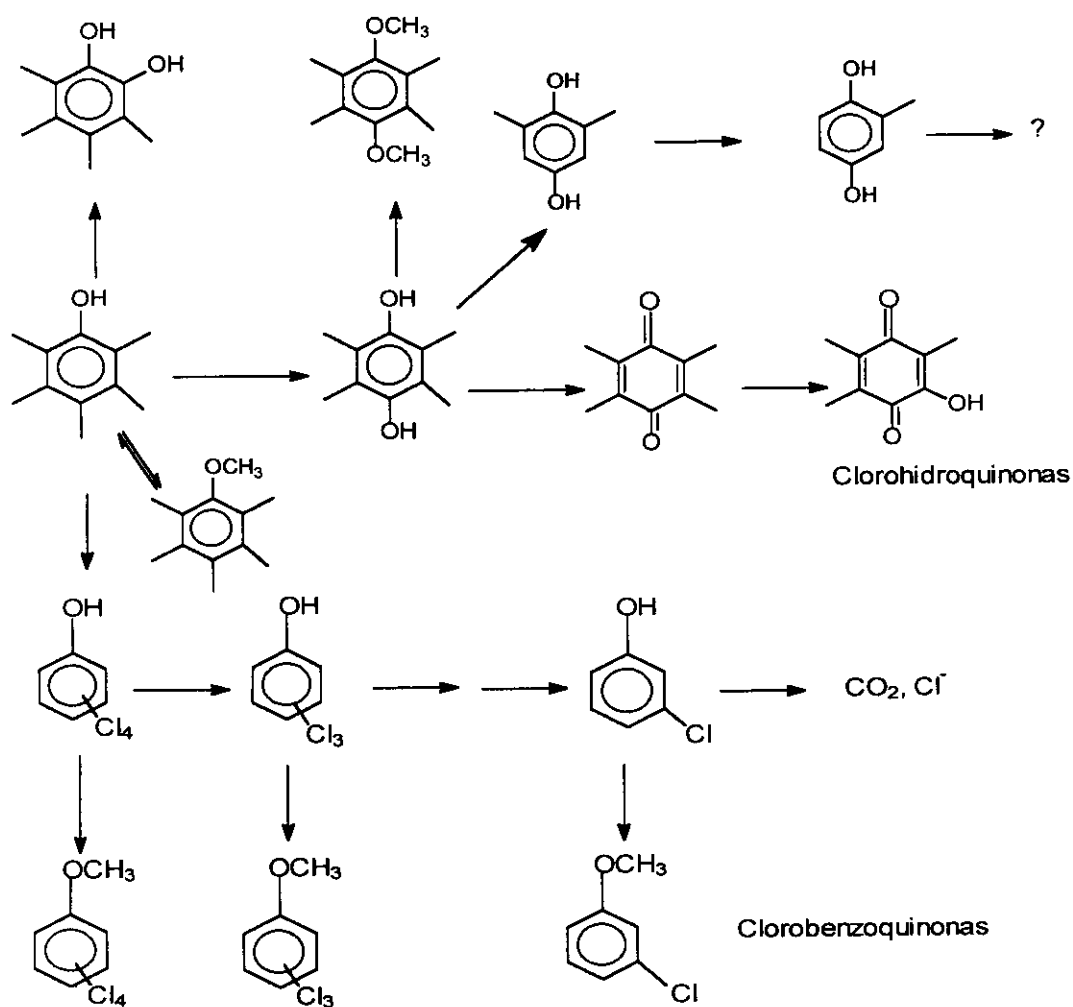


Figura 1. Rutas propuestas de degradación microbiana del PCF (Crosby y col., 1981). Los átomos de cloro sustituyentes se representan por líneas.

Desde hace varios años se han estado realizando estudios con diferentes microorganismos para determinar la capacidad de degradar al PCF, entre estos se encuentran algunas bacterias (Haggblomb y col., 1988; Lin y col., 1991) y hongos filamentosos (Mileski y col., 1988; Seigle-Murandi y col., 1990). En la tabla 2 se mencionan algunas especies degradadoras del PCF.

Tabla 2. Microorganismos capaces de degradar PCF.

| BACTERIAS | HONGOS |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Favobacterium sp.</i> | <i>Aspergillus sp.</i> |
| <i>Mycobacterium sp.</i> | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | <i>Rhizopus nigricans</i> |
| <i>Arthrobacter sp.</i> | <i>Trametes versicolor</i> |
| <i>Rhodococcus chlorophenolicus</i> | <i>Trichoderma virgatum</i> |
| <i>Agrobacterium radiobacter</i> | <i>Coniophora puteana</i> |

2.1.5.3.1 Degradación por bacterias.

Algunos géneros de bacterias se encuentran en lugares contaminados con compuestos tóxicos por lo que se han estudiado para ver si son capaces de degradar PCF y otros compuestos aromáticos tóxicos y así utilizarlos como alternativa en procesos de biodegradación y/o biorremediación. Crawford y Mohn (1985) encontraron que *Flavobacterium sp.* es capaz de degradar entre el 60 y 70% del PCF adicionado en un período de 10 días.

Yu y Ward (1994) aislaron un consorcio microbiano, en el cual identificaron varias especies y géneros de bacterias incluyendo a *Flavobacterium gleum*, *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas sp.*, que fueron capaces de degradar más del 80% en 4 días del PCF adicionado en el medio de cultivo (100 ppm inicial). Adicionando peptona y glucosa como fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente.

Hagblom y col. (1988) utilizaron *Rhodococcus sp.* y *Mycobacterium sp.*, aisladas de un suelo contaminado con clorofenoles y de lodos provenientes del tratamiento de aguas residuales de una planta de blanqueo de pulpa de papel, reportaron una

disminución total de las 2.66 ppm de ^{14}C -PCF adicionado y determinaron que de un 45 a un 70% del PCF adicionado fue convertido a $^{14}\text{CO}_2$ bajo las condiciones estudiadas. Además observaron que uno de los intermediarios formado de la degradación del PCF es el pentacloroanisol (PCA).

Edgehill y Finn (1983) estudiaron el efecto de la inoculación de un suelo con una cepa de *Arthrobacter sp.* sobre la degradación del PCF en condiciones ambientales. Bajo estas condiciones obtuvieron una disminución del contaminante de el 85% después de un período de 12 días. Dichas bacterias deshalogenan al PCF mediante un mecanismo enzimático dependiente del oxígeno e inducible por el propio contaminante, generando como posibles metabolitos al tetraclorocatecol, tetraclororesorcinol y tetracloroquinona (Schenk y col., 1989).

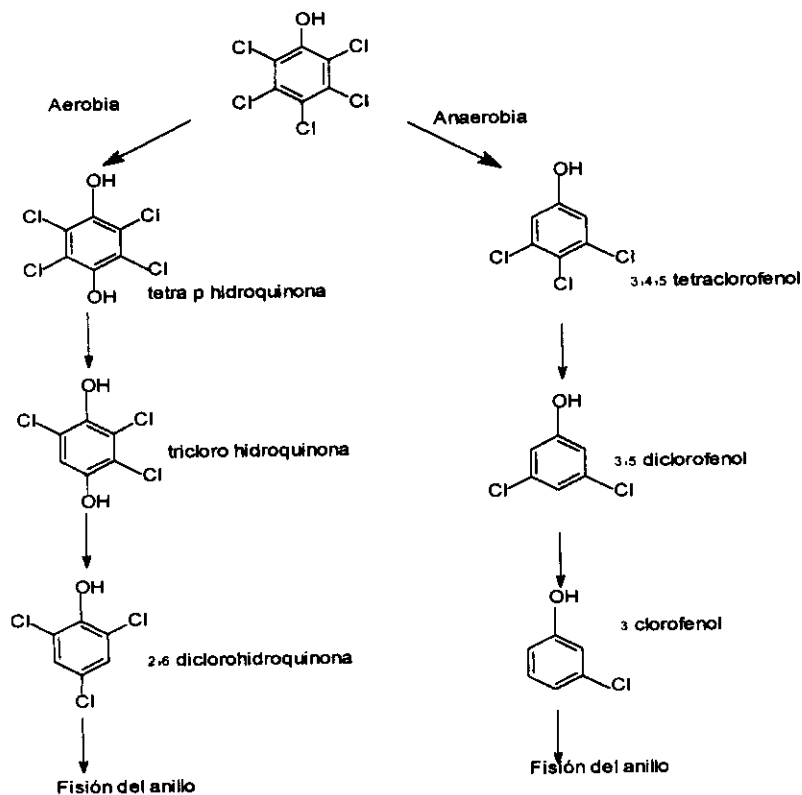


Fig. 2. Mecanismo de degradación del PCF por bacterias propuesto por varios autores

Para bacterias se han propuesto dos mecanismos por medio de los cuales se lleva a cabo la degradación del PCF. Uno cuando se encuentran las bacterias en condiciones aerobias y otro cuando las condiciones son anaerobias (figura 2). En condiciones aerobias el PCF en la primera etapa de la degradación es convertido a tetracloro-p-hidroquinona, luego a tricloroquinonas y diclorohidroquinonas y finalmente el rompimiento del anillo bencénico. En condiciones anaerobias el PCF es degradado a tri-, di- y monoclorofenoles, posteriormente se rompe el anillo produciendo metano y CO₂ (Reineke y Knackmuss, 1988; Chaudhly y Chapalamadugu, 1991).

2.1.5.3.2 Degradación por hongos filamentosos.

Desde hace varios años se conoce la capacidad que presentan varias especies de hongos para tolerar y transformar el PCF en cultivos líquidos y en sustratos sólidos como el suelo y la madera, por lo que, la degradación de PCF por hongos filamentosos ha sido ampliamente estudiada. Cserjesi y Johnson (1971) encontraron que el hongo *Trichoderma virgatum* es capaz de degradar el 75% del PCF adicionado inicialmente (10 ppm) en un periodo de incubación de 12 días. Esta especie mostró la capacidad de metabolizar entre un 10 y 20% del PCF adicionado generando como uno de los intermediarios el PCA.

Los Basidiomicete, principalmente los pertenecientes a los hongos de pudrición blanca han sido sujetos de numerosas investigaciones debido a su capacidad de degradar al PCF. Entre éstos la especie *Phanerochaete chrysosporium* es la más ampliamente estudiada (Lamar y col., 1990; Lamar y Dietrich, 1990; Milesky y col., 1988, Reddy, 1995).

Seigle-Murandi y col. (1993) investigaron la capacidad de degradación de PCF por diferentes grupos taxonómicos de Micromycetes de la colección micológica de Grenoble, Francia. Estudiaron la eliminación de 100 mg PCF/l en medio líquido sintético después de 5 días de incubación. Los Zigomicetes y Agonomycetales presentaron porcentajes elevados de eliminación, mientras que los Basidiomicetes mostraron una capacidad de degradación moderada y las levaduras muy poca capacidad degradadora.

2.1.5.3.3 Bioquímica de la degradación.

La habilidad que presenta *Phanerochaete chrysosporium* para degradar una gran variedad de compuestos tóxicos se debe a su sistema enzimático, el cual se expresa por la limitación de nutrientes en el medio (nitrógeno carbono o sulfuro) (Kirk y col., 1986; Jeffries y col., 1981). Se ha demostrado que estas enzimas catalizan la degradación de lignina y cloroligninas, también llevan acabo la oxidación de varios compuestos aromáticos halogenados como el lindano, DDT, PCF, benzopireno, creosota, etc. (Sanglard y col. 1986; Milesky y col., 1988).

Este sistema está compuesto de dos familias de hemo peroxidasas, conocidas como lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa y un sistema que genera H_2O_2 a partir del oxígeno molecular o de otros sustratos como la glucosa, el grixal o el metilgloxal (Barr y Aust, 1994). Este sistema enzimático es inducido cuando las concentraciones de nitrógeno, carbono o azufre en el medio son limitantes (Bumpus, 1985).

Las hemo peroxidasas presentes en *P. chrysosporium* utilizan el H_2O_2 para promover la oxidación de los compuestos a radicales libres. En estado de reposo el hierro del grupo hemo de la enzima se encuentra como férrico. El H_2O_2 oxida a la enzima férrica con dos electrones para llevarla hasta un estado activo conocido como compuesto I, un radical ferrilcatiónico (Fe IV) π -porfirina. La

sustancia a degradar puede ser entonces oxidada con un electrón y el compuesto I ser reducido para originar al compuesto II. Una oxidación subsecuente de otra molécula de la sustancia a degradar realizada por el compuesto II, devuelve a la peroxidasa a su estado de reposo. Por lo tanto, en este sistema no se requiere que la sustancia por degradar se una a la enzima, sino que la oxidación ocurre simplemente a través de la transferencia de electrones. El ciclo de reacciones de las peroxidasas se muestra en la figura 3.

Las reacciones que resultan de la acción de este sistema enzimático incluyen despolimerización parcial de la lignina, oxidación de alcohol veratrílico y ruptura de su anillo aromático, metilaciones y desmetilaciones, reducciones, hidroxilaciones y dimerizaciones (Aitken y col., 1994; Barr y Aust, 1994).

Los productos solubles de la degradación de la lignina son después absorbidos por las células y metabolizados a intermediarios del ciclo de Krebs para generar CO_2 como producto final (Higson, 1991).

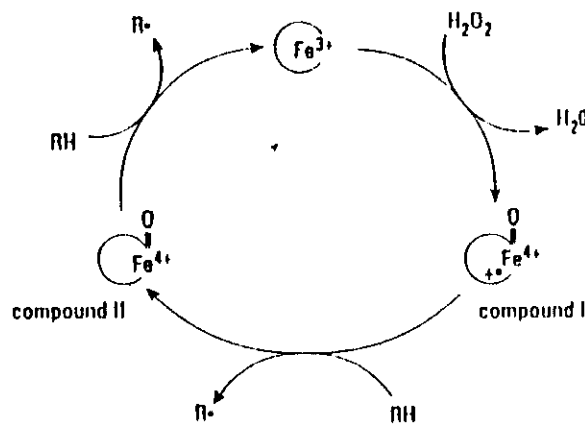
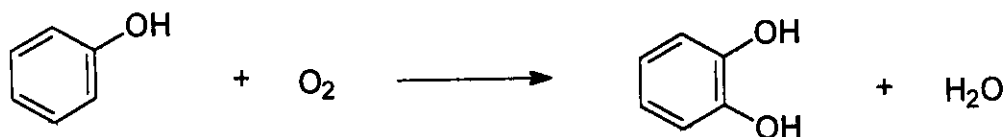


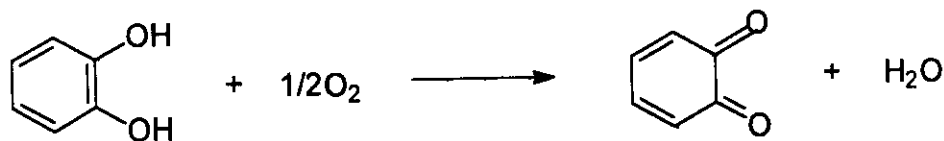
Figura 3 Ciclo catalítico de las peroxidasas.

Las fenoloxidasas (lacasa, tirosinasa) son otro grupo de enzimas extracelulares involucradas con la degradación de PCF y clorofenoles, este tipo de enzimas son producidas por otras especies de hongos como *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *Fusarium sp.* que es capaz de degradar PCF solo si hay tirosina en el medio de cultivo, esta degradación parece ser mediada por una tirosinasa (Kwasniewska, 1981). *Trametes versicolor* produce lacasa, que es una enzima extracelular, la cual cataliza la degradación clorofenoles (Roy-Arcand y col., 1991).

En varios trabajos se ha reportado que la oxidación de fenol puede ser catalizada por varias enzimas (Aitken y col., 1994) que incluyen a las peroxidasas, lacassas y tirosinasas. Las dos primeras utilizan el H_2O_2 como oxidante, mientras que la tirosinasa utiliza el oxígeno molecular. La tirosinasa es una enzima que contiene cobre que es capaz de catalizar dos tipos de reacciones (Sun y col., 1992). El primer tipo es una reacción de monooxigenación en la cual un átomo de oxígeno molecular es incorporado a la estructura aromática y el agente reductor es oxidado, el o-difenol generado por la reacción puede actuar como reductor, por esta razón no es necesario ningún cofactor externo:



El segundo tipo es una reacción de oxidación de un o-difenol a o-quinona, sin incorporar al oxígeno en el producto:



Leyva y col. (1996) investigaron la reacción de oxidación del fenol catalizada por la enzima tirosinasa en un reactor por lote. Esta reacción es en serie, primero el fenol se oxida produciendo catecol y luego este se oxida en otros productos de mayor peso molecular. Se requiere de oxígeno para que la reacción ocurra. Estos autores encontraron que el fenol en solución acuosa puede descomponerse eficientemente por medio de la enzima tirosinasa, lográndose conversiones del 100%.

Entre los Zigomicetes investigados recientemente que son capaces de degradar compuestos tóxicos se encuentran algunos del género *Rhizopus*. Nagarathnamma y col. (1999), encontraron que *Rhizopus oryzae* es capaz de decolorar un efluente Kraft. Otro Zigomicete de este género es *Rhizopus nigricans*, el cual presenta la capacidad de degradar el PCF hasta un 64% en 5 días en cultivo sumergido (Flores, 2000). Este proceso de degradación está involucrado con la producción de sistemas enzimáticos producidos por el hongo.

2.2 ASPECTOS GENERALES DEL HONGO *Rhizopus nigricans*.

2.2.1 Características de *R. nigricans*.

Rhizopus nigricans es un hongo filamentoso que pertenece a la clase de los zygomycetes y al orden de los mucorales junto con los géneros *Mucor* y *Absidia*. Los zigomicetos se caracterizan por su reproducción sexual, la cual culmina con la formación de zigosporas. La meiosis ocurre después de ser formada la zigospora y posteriormente su germinación. Sin embargo en su ciclo de vida se enfatiza la etapa haploide. Produce esporas asexuales móviles (esporangiosporas). Los hongos tienen un micelio vegetativo haploide bien desarrollado (figura 4).

2.3 CULTIVO EN MEDIO SOLIDO.

2.3.1. Características del sistema de fermentación sólida (SFS).

El sistema de fermentación sólida (SFS) puede ser definido como “aquel proceso en el cual se utiliza una matriz sólida para lograr el crecimiento de un cultivo microbiano en la superficie y en el interior de esta en ausencia de agua” (Lonsane y col., 1985). La matriz porosa puede ser un sustrato húmedo o un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes disueltos en agua. De esta manera se pueden distinguir dos tipos de SFS en función de la naturaleza de la fase sólida utilizada:

- 1) Cultivo sólido con una fase sustrato-soporte. La fase sólida está constituida de un material que asume simultáneamente la función de soporte y de fuente de nutrientes (Barrios, 1994).
- 2) Cultivo sólido con un soporte impregnado de un medio líquido. En este tipo de fermentaciones, la fase sólida está constituida por un soporte inerte que sirve de repertorio de una solución nutritiva. Los materiales utilizados son diversos y entre ellos se encuentra el bagacillo de caña de azúcar (Barrios y col., 1988).

2.3.2. Ventajas y desventajas.

El desarrollo microbiano en fermentaciones en estado sólido es diferente que en cultivo sumergido debido a la diferencia en fenómenos de superficie, contenido de humedad, estructura física y composición química del sustrato y el medio ambiente de los nutrientes, por nombrar unos cuantos factores.

Se presentan algunas ventajas y desventajas de este método en comparación con el cultivo sumergido. Algunas de las ventajas del SFS que se presentan Mudgett (1986) y Barrios (1994) son:

1. Los contenedores de fermentación pueden ser pequeños debido a que se utiliza poco agua y los sustratos obtenidos se encuentran concentrados.
2. No se requieren de tanques para medio semilla, ya que se pueden incluir inoculaciones con esporas.
3. La baja humedad reduce los problemas de contaminación.
4. Las condiciones del SFS para el crecimiento de hongos son muy similares a sus hábitats naturales.
5. La aireación es facilitada debido a la porosidad del material.
6. La producción de metabolitos puede ser mucho mayor que en cultivo sumergido.
7. Se puede hacer un uso directo de los sólidos fermentados.

Algunas de las desventajas que presenta el SFS son:

1. La adición de agua en fases tempranas de la fermentación puede incrementar los riesgos de contaminación bacteriana.
2. La inoculación de hongos se hace con esporas ya que es difícil inocular con micelio.
3. Los parámetros de cultivo como pH, no se pueden regular fácilmente.
4. Se puede dificultar recobrar el producto deseado de la fermentación, si éste es absorbido o contaminado con residuos del medio sólido.

Las variables del proceso que controlan el crecimiento y el metabolismo microbiano en fermentación sólida (Moo-Young y col., 1983; Mudgett, 1986) son:

- 1) La aireación y el mezclado.
- 2) El tamaño de partícula.
- 3) Los nutrientes.
- 4) Factores ambientales: pH, humedad y temperatura.
- 5) La densidad del inóculo.
- 6) La cepa utilizada.

III. ANTECEDENTES.

Villareal (1996) aisló algunas cepas silvestres de hongos de cuatro efluentes provenientes de diferentes industrias (papelera, tanería y refresquera). Dicho aislamiento se hizo en cultivo superficial por gradiente (mayor a menor concentración de PCF) en placa utilizando PDA (50%) y medio sintético Melin-Norkrans (50%) como medios con 50 ppm de PCF. Estas placas se inocularon con los efluentes y con muestras de suelo tomadas en la industria refresquera, se incubaron a 30°C durante 4-5 días. Se aislaron los hongos que crecieron sobre el medio Melin Norkrans y en la mayor concentración de PCF. Se seleccionaron cuatro cepas, las cuales se resembraron nuevamente en placa pero con mayor concentración de PCF (12.5 ppm). Se seleccionó la cepa que presentó mayor velocidad de crecimiento radial, la cepa seleccionada fue caracterizada como *Rhizopus nigricans*. Con la cepa seleccionada se realizaron experimentos para medir la tolerancia del hongo al PCF y posteriormente se comparó con *P. chrysosporium* en cultivo superficial en medio sintético con y sin limitación de nitrógeno. Se observó que el crecimiento radial de *R. nigricans* se inhibe un poco por la presencia del PCF en el medio. Sin embargo, se encontró que la biomasa producida se afectó más por la limitación de N₂ que por la presencia del PCF.

Flores (2000) encontró que *R. nigricans* fue capaz de tolerar hasta 100 ppm de PCF en cultivo superficial a diferencia de *P. chrysosporium* que solamente toleró hasta 50 ppm.

Se observó que la tolerancia de *R. nigricans* es menor en cultivo sumergido que en cultivo superficial. Se demostró que *R. nigricans* es capaz de degradar PCF en cultivo sumergido hasta el 65% en 168h mientras que *P. chrysosporium* lo hace en 144h, ambos con 12.5 ppm de PCF inicial. El PCF inhibe la germinación de las esporas de *R. nigricans* (Flores, 2000) y de *P. chrysosporium* (Mileski y col., 1988) por eso se debe de adicionar cuando estas se encuentran germinadas. Se observó que la edad del cultivo al cual se adiciona el PCF es un factor importante en la eficiencia de degradación de *R. nigricans*, con micelio de 48h se obtiene el 70% de degradación a las 168h, mientras que con micelio de 24 y 96 h el 45 y 70% de degradación respectivamente a las 168h.

IV. JUSTIFICACION.

La contaminación de suelo y aguas subterráneos ha recibido poca atención en México, a pesar de la evidente contaminación causada por actividades industriales. En nuestro país, aproximadamente el 90% de las aguas de desecho provienen de cuatro grandes industrias: la industria del azúcar; la de la pulpa y de papel; del acero y la del petróleo y refinados (Poggi y col., 1989). Estas aguas de desecho industrial contienen en diversas proporciones clorofenoles y otros compuestos tóxicos recalcitrantes, bioacumulables y que se fijan en el tejido adiposo. Por lo que es importante proponer procesos para la degradación de estos compuestos y/o la biorremediación (Bergbauer y col., 1992; Freiter, 1979). Para la degradación de este compuesto por métodos biológicos, se han empleado algunas bacterias y hongos que degradan este compuesto por vía aerobia. Entre los microorganismos más estudiados para degradar este compuesto se encuentran los hongos filamentosos del grupo basidiomicetes, principalmente los de pudrición de blanca. (Datta y col., 1991; Sutherly y col., 1995; Kirk y col., 1986).

Sin embargo, para que los procesos sean más eficientes se requieren cepas con una tasa de degradación más alta y cortos tiempos de crecimiento, por lo cual, se han realizados estudios de aislamiento de otras cepas diferentes a los bacidiomicetes. Seigle-Murandi y col., (1993) reportaron un gran número de micromycetes de diferentes grupos taxonómicos capaces de degradar PCF como algunos zygomycetes y ascomycetes que presentan tasas de degradación elevadas. En la degradación de compuestos aromático por hongos, se tienen implicadas diferentes enzimas como fenoloxidasas (lacasa y tirosinas) y ligninasas (manganeso y lignina peroxidasas) (Kwasniewska, 1981; Nagarathnamma, 1999; Mileski y col., 1988).

R. nigricans presenta mayor tolerancia al PCF que *P. chrysosporium*, sin embargo la capacidad de degradación es menor bajo las condiciones estudiadas (Flores, 2000). Por esta razón es importante determinar las condiciones de cultivo de

R. nigricans bajo las cuales se obtenga la mayor degradación. Así como identificar las enzimas que intervienen durante la degradación con la finalidad de aumentar la capacidad de degradación de *R. nigricans* y poder usar esta cepa en procesos de biodegradación y/o biorremediación.

V. HIPOTESIS.

La capacidad de degradación de PCF por *R. nigricans* puede incrementarse por las condiciones y/o el tipo de cultivo empleado

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de degradación del pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans* en cultivo sumergido y cultivo sólido.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES.

- ◆ Determinar las condiciones de cultivo sumergido para la degradación de pentaclorofenol por medio de un diseño factorial.
- ◆ Determinar la(s) enzima(s) que intervienen en la degradación del pentaclorofenol en cultivo sumergido de *R. nigricans*.
- ◆ Determinar la capacidad de degradación del PCF por *R. nigricans* en cultivo sólido utilizando como soporte inerte bagacillo de caña.
- ◆ Determinar la máxima tolerancia al pentaclorofenol por *R. nigricans* en cultivo sólido.

VIII. MATERIAL Y METODOS.

8.1 MICROORGANISMO.

Las cepas empleadas en este estudio fueron: *Phanerochaete chrysosporium* (h-298 CDBB-500) y *Trametes versicolor* (H-1051 CDBB-500) de la Colección Microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN. *Pleurotus ostreatus* (Tlaxcala) de la Colección de hongos del laboratorio de Productos Naturales de la UAM-I y una cepa silvestre de *Rhizopus nigricans* aislada de un efluente de la industria papelera en el laboratorio de Ingeniería Genética de Microorganismos de la UAM-I (Villarreal, 1996).

8.2. MEDIOS DE CULTIVO.

8.2.1 Medio de esporulación y conservación de *R. nigricans*.

Agar Papa Dextrosa (PDA) (Bioxon) para conservación y esporulación de *R. nigricans*.

8.2.2 Cultivo sumergido.

1) Medio Melin-Norkrans modificado (Ainsworth, 1995; Villarreal, 1996) para todos los experimentos realizados con *R. nigricans* en cultivo sumergido, cuyo contenido en un litro de solución buffer de citratos-agua destilada al 50% es: 10.0 g de glucosa (Baker), 1.0g de extracto de levadura (Bioxon), 0.5g de KH_2PO_4 (Baker), 0.15g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Baker) y 0.5g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Baker) (relación C/N baja) y sin $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (relación alta C/N). Ambos medios ajustados a un valor de pH=5.6 ó 6.2 según los ensayos realizados (Bernal, 1999).

2) Medio Kirk (Tien y Kirk, 1988) para experimentos realizados con *P. chrysosporium* en cultivo sumergido, contenido en un litro de agua desionizada: 10.0g de glucosa (Baker), 0.20g de KH_2PO_4 (Baker), 0.50g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Baker), 0.080g de CaCl_2 (Baker), 0.048g de NH_4NO_3 (Baker), 0.0792g de L-asparagina (Sigma), 0.5 ml de solución de vitaminas (apéndice A) y 1 ml de solución de minerales (apéndice A), ajustado a pH 4.5.

8.2.3 Sistema de fermentación sólida.

Para cultivo sólido se utilizó el mismo medio Melin-Norkrans modificado (relación C/N baja) concentrado 2, 3, 5 y 6 veces según los experimentos realizados.

8.2.4 Medios para pruebas cualitativas de enzimas.

1) Medio Melin-Norkrans antes mencionado con 15.0 g de agar bacteriológico.

2) Extracto de Malta al 2% (Bioxion) solidificado con agar bacteriológico (Bioxion) al 1.5%.

3) Agar Papa Dextrosa (PDA) (Bioxion).

8.3 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.

R. nigricans y *P. chrysosporium* se conservaron en forma de micelio en cilindros de agar, los cuales se obtuvieron de placas de PDA incubadas a 30°C para *R. nigricans* y a 39°C para *P. chrysosporium*, ambos incubados por 3 días. Los cilindros se cortaron con un horador de 7mm de diámetro, estos cilindros se colocaron en microtubos con una solución glicerol-agua al 25% y congelados a -70°C. También se conservaron en tubos con PDA en forma inclinada los cuales fueron sembrados por estría e incubados a 30°C para *R. nigricans* y a 39°C para *P. chrysosporium*, ambos por 2 días, una vez formado el micelio se les agregó aceite mineral estéril y se almacenaron a 4°C.

8.4 ESPORULACIÓN.

La esporulación de *R. nigricans* se realizó en matraces Erlenmeyer que contenían 50ml de medio PDA, se inocularon con cilindros de agar, los cuales se encontraban conservados a -70°C en glicerol al 25%. Estos matraces se incubaron a 30°C por 5 días. Una vez esporulado el hongo se realizó el desprendimiento de las esporas adicionando 10 ml de una solución acuosa de tween 80 al 0.1% y se sometió a agitación magnética de 5-10 min. Posteriormente se tomó una muestra de la cosecha de esporas y se hizo un conteo en una cámara de Neubauer.

En el caso de *P. chrysosporium* se prepararon botellas de cultivo con 50 ml de EMA 2% y se inocularon con cilindros de agar que contenían micelio del hongo. Se incubaron a 39°C por 8 días, tiempo requerido para lograr una esporulación homogénea en la superficie del medio de cultivo. Al término de dicho periodo, las esporas fueron cosechadas agregando a cada botella de cultivo perlas de ebullición y 5 ml de solución acuosa de tween 80 al 0.1% se agitó manualmente para desprender las esporas y obtener la suspensión. La concentración de esporas se calculó mediante el conteo de éstas en una cámara de Neubauer.

8.5 CONDICIONES DE CULTIVO

8.5.1 Cultivo sumergido.

Para todos los experimentos realizados en cultivo sumergido se prepararon matraces Erlenmeyer de 250ml con 50 ml de medio Melin-Norkrans modificado en buffer de citratos. Los matraces se inocularon con 1×10^6 esp/ml, las esporas se obtuvieron como se describe en el punto anterior, estos matraces fueron incubados a 30°C con agitación de 125 rpm, a las 48 h de iniciado el cultivo se agregó el PCF en una concentración inicial de 12.5 ppm.

8.5.1.1 Diseño factorial

Se realizó un diseño factorial 4^2 para determinar las condiciones de cultivo sumergido para la degradación de PCF por *R. nigricans*.

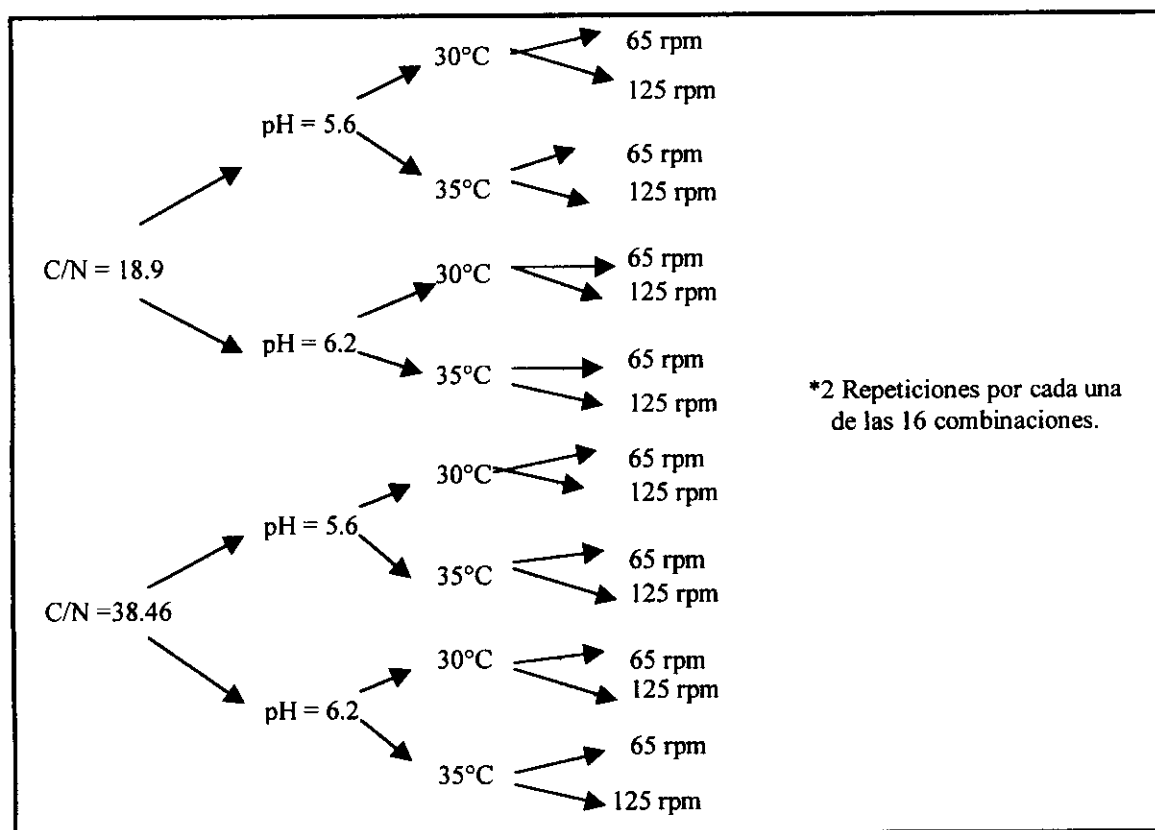


Figura 6. Diseño factorial de 4 factores con 2 niveles cada uno. Relación C/N, pH, temperatura y agitación. 16 tratamientos distintos con 2 repeticiones cada uno.

Los parámetros considerados dentro del diseño fueron: relación C/N, pH, temperatura y agitación con dos niveles cada uno. Se realizaron 16 tratamientos distintos, cada uno por duplicado, en cultivo sumergido. Para el diseño se prepararon matraces Erlenmeyer de 250ml con 50 ml de medio Melin-Norkrans, el cual se preparó de dos formas, limitado en nitrógeno (relación C/N=38.46) y no limitado (relación C/N=18.9) con dos niveles de pH cada uno (5.5 y 6.2). Los matraces se inocularon con 1×10^6 esp/ml de *R. nigricans*, estos matraces fueron incubados bajo agitación según las condiciones para cada uno de los 16 tratamientos distintos, estas condiciones se describen en la figura 6 del diseño factorial. A las 48 h de iniciado el cultivo, cuando las esporas ya se encontraban germinadas, se adicionó el PCF a una concentración inicial de 12.5 ppm. Se prepararon controles sin PCF. Se tomaron muestras a las 48 h y 140h.

8.5.1.2 Actividad enzimática (LiP)

Se realizaron experimentos para medir la actividad enzimática de LiP en cultivo sumergido con *R. nigricans*. Se prepararon matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio Melin-Norkrans modificado (no limitado en nitrógeno), los cuales se inocularon con 1×10^6 esp/ml de *R. nigricans*, estos cultivos fueron incubados a 30°C y 125 rpm. A las 48 de iniciado el cultivo se agregó el PCF (12.5 ppm). Se tomaron muestras por duplicado después de inocular (t_0), a las 48h (después de la adición del PCF), 120 y 168 h. A estas muestras se les midió actividad enzimática por la técnica de la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído (Tien y Kirk, 1988).

Se utilizó como control positivo el *P. chrysosporium* h-298. Se prepararon matraces Erlenmeyer con 50ml de medio Kirk (Kirk y col., 1986), se inocularon con 1×10^6 esp/ml de *P. chrysosporium*. Se incubaron a 39°C y 200 rpm. A las 19 h de incubación se adicionó el PCF (12.5ppm). Se tomaron muestras por cuatriplicado a las 72 h. Se prepararon controles sin PCF. A todos los cultivos se les midió actividad enzimática de LiP.

8.5.1.3 Cultivo sumergido con tirosina.

Para este experimento se prepararon matraces Erlenmeyer con medio Melin-Norkrans no limitado en nitrógeno (relación C/N=18.9), a este medio se adicionó tirosina en diferentes concentración según el experimento a realizar. Las concentraciones de tirosina probadas fueron de 0.08, 0.13, 0.195 y 0.26 g/l, los matraces se inocularon con 1×10^6 esp/ml, se incubaron a 30°C con una agitación de 125 rpm. A las 48 h de iniciado el cultivo se agregó el PCF a una concentración de 12.5 ppm. Se prepararon 4 controles diferentes, el primero con tirosina sin PCF, estos se inocularon con esporas del hongo para observar el crecimiento del microorganismo en presencia de tirosina. El segundo con tirosina, con PCF y sin inóculo para observar si no se presentaba degradación abiótica del tóxico y si la presencia de la tirosina no interfería con la técnica de cuantificación del PCF. El tercero sin tirosina, con PCF e inoculado con esporas del hongo para medir el porcentaje de degradación y el último sin tirosina, sin PCF e inoculado para comparar el efecto de la tirosina sobre el crecimiento. Se tomaron muestras al tiempo inicial (momento de inocular), 48, 96 y 168 h.

8.5.2 Cultivo superficial

Las pruebas cualitativas para determinar enzimas extracelulares producidas por *R. nigricans* se realizaron en cultivo superficial en placas de PDA, EMA 2% y medio Melin-Norkrans con diferentes reactivos según la enzima a identificar. Los sustratos utilizados fueron siringaldazina (0.1% (w/v) en etanol al 95%) para identificar lacasa; para peroxidasas la misma solución de sinringaldazina más peróxido de hidrógeno (0.4% en agua destilada preparado antes de cada ensayo); ácido tánico (0.05% en agua destilada) y p-cresol (1×10^{-3} M en etanol al 96%) para tirosinasas. Cada una de las placas fueron inundadas con 5 ml de reactivo según la prueba a realizar, el cual fue retirado inmediatamente, posteriormente las placas fueron inoculadas con cilindros de agar que contenían micelio de *R. nigricans* de 3 días de edad e incubadas a 30°C por 10 días en la oscuridad para permitir que se

desarrollara la reacción (Harkin y Obst., 1973; Thompson y Cannon, 1984; Seigle-Murandi y col., 1993; Score y col., 1997).

Se utilizaron como controles positivos para confirmar la confiabilidad de las pruebas, los hongos utilizados fueron *P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *P. ostreatus* ya que algunas de las enzimas que estos hongos producen han sido muy estudiadas. *P. chrysosporium* se incubó por 10 días a 45°C. *T. versicolor* y *P. ostreatus* se incubaron por 3 días a 27°C.

8.5.3 Fermentación sólida.

8.5.3.1 Pretratamiento del soporte.

Se empleó como soporte bagacillo de caña. El bagacillo se tamizó en mallas del No. 30 y 50 utilizando solamente las partículas retenidas entre estas dos mallas. Para el pretratamiento del bagacillo, se mezcló éste con el 50% del agua total que se iba a utilizar en el medio y se utilizó una autoclave para someterlo a una presión de 3 lb/pulg² (101°C) por 30 minutos y posteriormente se esterilizó a 15 lb/pulg² (121°C) durante 20 minutos.

8.5.3.2 Preparación del SFS.

El bagacillo pretratado y estéril se mezcló con el medio de cultivo Melin-Norkrans concentrado y con el PCF (12.5 ppm/g de bagazo húmedo), este bagazo húmedo se inoculó con 1×10^7 esp/g de bagazo húmedo, las esporas se mezclaron perfectamente para homogeneizar el inóculo en todo el medio sólido.

El sistema de fermentación sólida (SFS) utilizado (Raimbault, 1980 y Barrios y col., 1988) consiste en columnas de vidrio de 15cm de largo y 2 cm, las cuales se empacaron con 12 g del medio sólido con una densidad de empaque de 0.26 g/ml. Las columnas fueron sumergidas en un baño de agua a 30°C para controlar la temperatura. Se hizo circular aire con un flujo de 2.6 l/h a través de agua contenida en un burbujeador de vidrio con la finalidad de que este aire pasara húmedo a través del medio sólido empacado en la columna y este no perdiera la humedad requerida para llevar a cabo la fermentación. Los gases producidos dentro de cada columna se pasaron a través de una columna de silicagel para quitarles la humedad antes de entrar a un cromatógrafo de gases (Go Mac) para determinar el CO₂ producido, el equipo esta acoplado a una computadora (Acer) provista de un programa para analizar estos gases (figura 7).

Se tomaron muestras por duplicado al momento de inocular el bagazo húmedo, al tiempo inicial y a las 96 h, tiempo final. Para las cinéticas en SFS se tomaron muestras por duplicado cada 24 h hasta las 96 h.

Para observar la tolerancia de *R. nigricans* al PCF en SFS se montaron fermentaciones en medio sólido como se mencionó anteriormente, solamente que se aumentó la concentración del PCF, las concentraciones probadas fueron: 25, 50 y 100 ppm. Para el muestreo se tomaron columnas completas por duplicado para cada tiempo. Los tiempos de muestreo fueron después de inocular (tiempo 0) y a las 96h (tiempo final).

Para todos los experimentos se prepararon controles con PCF sin inóculo para observar si había degradación abiótica del tóxico y controles sin PCF inoculados para observar si la presencia de PCF en el medio sólido producía algún efecto tóxico sobre el microorganismo.

Medio Melin-Norkrans concentrado
+ PCF (12.5 ppm)
+ Esporas (1×10^7 esp/g B.H.)

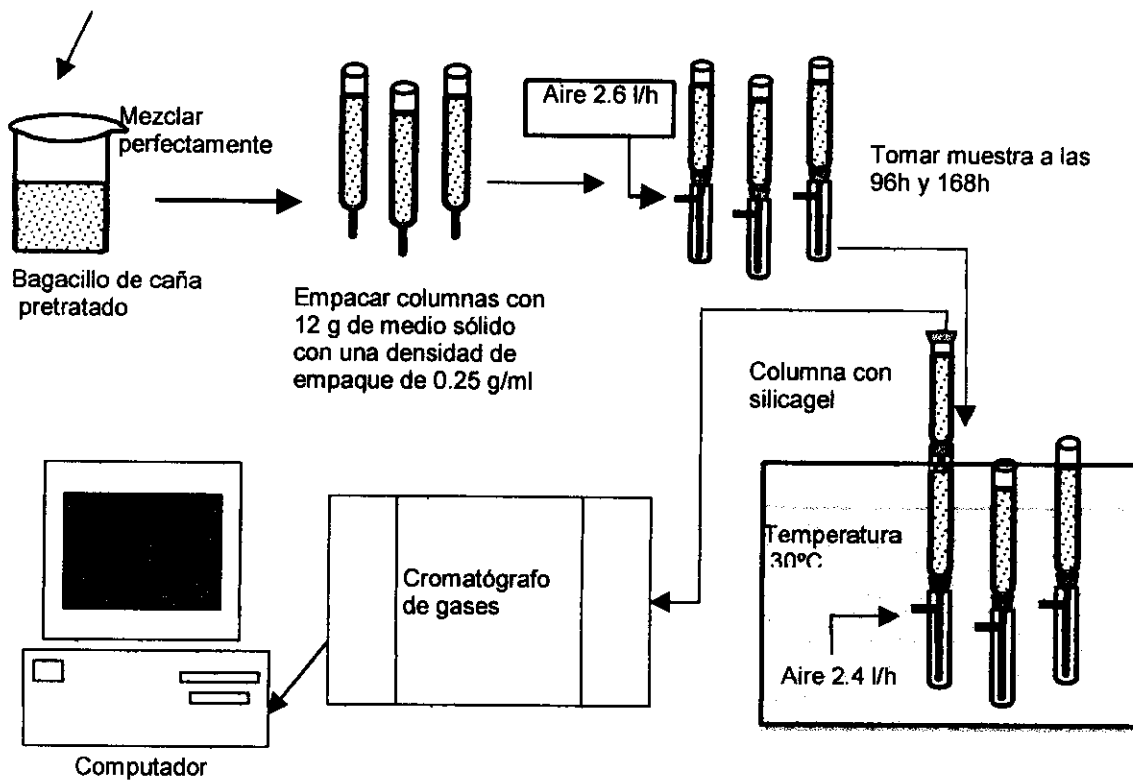


Figura 7. Sistema de Fermentación sólida (SFS) con bagacillo de caña como soporte.

8.6 TECNICAS ANALITICAS.

8.6.1 Cultivo sumergido.

8.6.1.1 Biomasa.

Se determinó por peso seco, el medio de cultivo se filtró al vacío en papel filtro Watman no. 1 y se lavó con agua destilada. La biomasa obtenida se secó a 70-80°C por 24h. Por diferencia de peso se calculó la biomasa producida (mg/ml).

8.6.1.2 pH.

Se midió directamente en el medio de cultivo con un potenciómetro marca JENCO ELECTRONICS. LTD.

8.6.1.3 Extracción del PCF.

La técnica para extraer el PCF de los cultivos de *R. nigricans* que se utilizó (Flores, 2000) consta de dos etapas:

a) Extracción de PCF en el extracto crudo.

Después de filtrar el medio de cultivo para separar la biomasa se tomó el extracto crudo de cada matraz que se analizó, a este se le ajustó el pH a 11 con NaOH al 40%. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm a 4°C por 15 minutos en una centrífuga refrigerada Beckman avanty 30. El sobrenadante se filtró con una membrana de poro 0.22µm de diámetro (Waters). En el sobrenadante se cuantificó el PCF de los cultivos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

b) Extracción del PCF adsorbido al micelio.

El micelio separado del medio de cultivo se suspendió en 25 ml de buffer de carbonatos pH=10.6. Se sometió a un baño de ultrasonido Branson (modelo 1210) por 10 minutos con el fin de

desprender el PCF adherido a la pared del hongo. Después de sonicado se volvió a filtrar al vacío con papel Watman no. 1. La biomasa se cuantificó por peso seco. El líquido residual del filtrado se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos en una centrífuga refrigerada. El sobrenadante fue tratado para el análisis por HPLC igual que las muestras del paso anterior.

8.6.1.4 Cuantificación de PCF.

La concentración del PCF fue cuantificada por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se empleó un programa isocrático con un detector ultravioleta de Waters (modelo 441) a una longitud de onda de 280 nm y un integrador de la misma marca (modelo 740). Se utilizó una columna μ Bondapack C₁₈ (Waters) de fase reversa con una longitud de 150 mm X 4.6 mm de diámetro. Como fase móvil se usó una solución constituida por solución A: ácido acético al 1% en agua y solución B: ácido acético al 1% en acetonitrilo, en proporción 75:25 a un flujo de 0.8 ml/min y 230 psi de presión. Todos los reactivos fueron grado HPLC (Baker). El volumen de inyección de las muestras fue 40 μ l. Se utilizó una solución estándar de pentaclorofenato de sodio (Sigma). Se inyectaron 40 μ l de esta solución y se obtuvo un R_T de 4.5 minutos.

8.6.1.5 Actividad enzimática de LiP.

La actividad enzimática de lignina peroxidasa (LiP) de *R. nigricans* y *P. chrysosporium* en cultivo sumergido se cuantificó por el método de Kirk (Tien y Kirk, 1988). El fundamento de este método consiste en la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído usando como sustrato peróxido de hidrógeno. Los cultivos se filtraron para separar la biomasa del caldo. El caldo de cultivo se usó para determinar la actividad enzimática, este se centrifugó a 7500rpm a 4°C durante 15 min. El filtrado se mantuvo a 4°C para evitar la desnaturalización de la enzima y

en este se determinó la actividad de la lignina peroxidasa. El volumen total de la mezcla de reacción fue 2.8 ml conteniendo 0.6 ml de solución amortiguadora de tartratos 0.01M (pH 2.5), 0.2 ml de solución de alcohol veratrílico ($\epsilon=9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Aldrich) 4mM, 1.8 ml del filtrado y 0.2 ml de H_2O_2 (Merk) 0.4mM. La absorbancia se leyó a 310 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu (modelo UV-1201) con el programa Kinetic-2 que muestra el cambio de absorbancia por minuto (A/min).

8.6.2 Fermentación sólida.

8.6.2.1 pH.

Para determinar el valor de pH en SFS, se tomó 1 g de bagacillo fermentado se agregaron 10 ml de agua destilada y se agitó con una barra magnética en un agitador. Se midió el pH directamente sin dejar de agitar con un potenciómetro JENCO ELECTRONICS. LTD.

8.6.2.2 Humedad.

Se pesaron 3 g de bagazo fermentado y se secaron en una estufa a 70-80°C por 24h. Por diferencia de peso se calculó el contenido de humedad.

8.6.2.3 Evolución de CO_2 .

Para medir de una manera indirecta el crecimiento de *R. nigricans* se determinó el CO_2 producido en cada columna éste se cuantificó por cromatografía de gases (figura 2).

8.6.2.4 Extracción del PCF.

Se montó la técnica para la extracción del PCF en muestras de SFS. La técnica elegida se presenta en el capítulo de resultados y discusión.

8.6.2.5 Cuantificación del PCF residual.

Todos los extractos obtenidos con la técnica de extracción de muestras del SFS fueron analizados por HPLC para determinar el PCF residual de la misma forma que en cultivo sumergido.

8.6.2.6 Germinación de esporas.

Para la germinación de las esporas de *R. nigricans* en sistema de fermentación sólida se hicieron observaciones en un microscopio Cannon (modelo) a 40x.

IX. RESULTADOS Y DISCUSION.

9.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SUMERGIDO PARA LA MAYOR DEGRADACIÓN DE PCF POR *R. nigricans*.

9.1.1 Análisis estadístico del diseño factorial.

Se realizó un diseño factorial 4^2 para determinar las condiciones de cultivo sumergido para la degradación de PCF por *R. nigricans*. Los parámetros considerados dentro del diseño fueron: relación C/N, pH (utilizando buffer de citratos), temperatura y agitación con dos niveles cada uno. El PCF se adicionó a las 48 h ya que en experimentos anteriores se demostró que el PCF inhibe la germinación de las esporas de *R. nigricans* (Flores, 2000). Este mismo efecto tóxico se presenta en la germinación de las esporas de *P. chrysosporium* en presencia de 4 ppm de PCF (Mileski y col., 1988). Estos autores asumen que el PCF es un inhibidor de la fosforilación oxidativa por lo tanto no permite cubrir los requerimientos energéticos para la germinación de las esporas. Por otro lado se encontró que cuando en cultivos de *R. nigricans* se adiciona el PCF a las 48 h se tiene la mayor tasa de degradación (Flores, 1999).

Los matraces fueron inoculados con 1×10^6 esp/ml y se incubaron bajo las condiciones descritas por el diseño factorial como se muestra en la figura 5. A cada muestra se le cuantificó la biomasa producida, el cambio en el pH y la concentración de PCF residual a las 48 h (adición del PCF) y 140 h (tiempo final). Los resultados fueron analizados por el programa estadístico SPSS para un diseño factorial manejando como variable respuesta el mayor porcentaje de degradación de PCF por *R. nigricans*.

Los resultados del análisis estadístico (tabla 3) mostraron que la relación C/N, el pH y la agitación en forma independiente tienen efecto sobre la degradación del PCF por *R. nigricans* ya que sus niveles de significancia (0.008, 0.001 y 0.0001 respectivamente) son menores al valor máximo de α (0.05). A diferencia de la

temperatura que como factor independiente presenta un alto nivel de significancia de 0.221 el cual es mayor que el valor máximo de α , esto indica que la temperatura no tiene efecto sobre la degradación del PCF, es decir, que no hay diferencias significativas en la degradación de PCF por *R. nigricans* utilizando cualquiera de los dos niveles de temperatura que se consideraron dentro de este diseño. Sin embargo, la interacción de los cuatro factores presenta una significancia de 0.0001 con un valor de $\alpha=0.05$. Este último resultado es importante ya que indica que existe al menos un nivel de relación C/N, uno de temperatura, uno de pH y uno de agitación que combinados producen un valor distinto de degradación de PCF por *R. nigricans*.

Tabla 3. Resultados obtenidos del diseño factorial por el programa estadístico SPSS para determinar el efecto que tienen los diferentes factores sobre la degradación del PCF por *R. nigricans*.

| Fuente | Suma de Cuadrados | g. l. | Cuadrados medios | F | Sig. |
|-----------------|-------------------|-------|------------------|---------|------|
| C/N | 98.350 | 1 | 98.350 | 9.060 | .008 |
| PH | 161.550 | 1 | 161.550 | 14.882 | .001 |
| Temp | 17.582 | 1 | 17.582 | 1.620 | .221 |
| Rpm | 1127.413 | 1 | 1127.413 | 103.855 | .000 |
| C/N*pH*temp*rpm | 2422.301 | 11 | 220.209 | 20.285 | .000 |
| Error | 173.691 | 16 | 10.856 | | |
| Total | 63311733 | 32 | | | |

Variable dependiente: Degradación de PCF
 $\alpha=0.05$.

Finalmente se hizo una estimación de medias de los 16 tratamientos para determinar las condiciones bajo las cuales se obtuvo la máxima y la mínima degradación de PCF. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. La máxima degradación de PCF por *R. nigricans* fue del 66.5% y la mínima fue de 16.7%. Además del tratamiento que presentó mayor porcentaje de degradación se obtuvieron otros que presentaron tasas altas de degradación (55.7 y 51.5%) por lo que también fueron consideradas para la elección de las condiciones más eficientes.

Las eficiencias de degradación se calcularon considerando la biomasa producida y el tiempo de degradación se obtuvieron los valores siguientes $0.028 \text{ mg PCF} \cdot \text{mg}^{-1} \text{X} \cdot \text{h}^{-1}$ para el tratamiento con el cual se obtuvo el 66.5% y $0.024 \text{ mg PCF} \cdot \text{mg}^{-1} \text{X} \cdot \text{h}^{-1}$ para los tratamientos seleccionados, esto indicó que la mejor eficiencia de degradación se obtuvo aplicando el tratamiento con los siguientes parámetros: Relación C/N= 18.9, pH 5.6, T=30°C y con una agitación de 125 rpm. Estos parámetros fueron utilizados en todos los experimentos posteriores a este con *R. nigricans* para la degradación de PCF en cultivo sumergido.

Tabla 4. Estimación de medias por el programa estadístico SPSS para obtener el mayor porcentaje de degradación de PCF por *R. nigricans*.

| C/N | PH | Temp | rpm | Media | Error estand. | 95% intervalo de confianza | | |
|------|-------|------|-----|---------------|---------------|----------------------------|-------------|--------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | |
| 18.9 | 5.6 | 30 | 65 | 51.460 | 2.330 | 46.521 | 56.399 | |
| | | | 125 | 66.505 | 2.330 | 61.566 | 71.444 | |
| | | 35 | 65 | 37.425 | 2.330 | 32.486 | 42.364 | |
| | | | 125 | 42.375 | 2.330 | 37.436 | 47.314 | |
| | | 6.2 | 30 | 65 | 38.535 | 2.330 | 33.596 | 43.474 |
| | | | | 125 | 42.375 | 2.330 | 37.436 | 47.314 |
| | 35 | | 65 | 16.735 | 2.330 | 11.796 | 21.674 | |
| | | | 125 | 49.700 | 2.330 | 44.761 | 54.639 | |
| | 38.46 | 5.6 | 30 | 65 | 28.015 | 2.330 | 23.076 | 32.954 |
| | | | | 125 | 37.605 | 2.330 | 32.666 | 42.544 |
| | | | 35 | 65 | 38.435 | 2.330 | 33.496 | 43.374 |
| | | | | 125 | 47.240 | 2.330 | 42.301 | 52.179 |
| 6.2 | | | 30 | 65 | 38.435 | 2.330 | 38.171 | 48.049 |
| | | | | 125 | 47.240 | 2.330 | 37.801 | 47.679 |
| | | 35 | 65 | 43.215 | 2.330 | 38.276 | 48.154 | |
| | | | 125 | 50.030 | 2.330 | 45.091 | 54.969 | |

Variable dependiente: Degradación.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de pH, biomasa, porcentaje y eficiencia de degradación de PCF para todos los tratamientos, a las 48 y 140 h.

Los resultados de pH mostraron que con la relación C/N de 18.9 a las 48 h de iniciado el cultivo (adición del PCF) hay una ligera disminución de los valores de pH inicial (5.5 y 6.2) probablemente porque en este momento las esporas de *R. nigricans* están completamente germinadas y la fuente de carbono de fácil asimilación (glucosa) está siendo consumida por el microorganismo y a las 140 h hay un aumento en los valores de pH, este aumento podría deberse a la formación de

los productos formados por la degradación del PCF por el hongo. El rango de pH para esta relación C/N fue entre 6.9 y 7.3, el único valor que se obtuvo por debajo de este rango fue de 5.8 que corresponde a las condiciones bajo las cuales se obtuvo el menor porcentaje de degradación de PCF (16%).

Con la relación C/N de 38.46 los valores de pH a las 48 h disminuyeron más que la con la otra relación ya que a ese tiempo se observaron valores de pH en un rango de 3.6 a 5.0 y a las 140 h los valores de pH se mantuvieron casi constantes (3.9-5.2). El pH osciló entre 3.9 y 5.3. Se observó que en los tratamientos con relación C/N de 18.9 el cambio de pH fue mayor con respecto al tiempo que con la otra relación probada probablemente porque con la relación C/N de 18.9 hay más nitrógeno en el medio y se forman sales de amonio lo que provocó el aumento de los valores de pH. Los porcentajes de degradación con la relación C/N de 38.46 fueron más bajos que los obtenidos con el medio no limitado en nitrógeno ya que la máxima degradación obtenida fue del 50%.

Con respecto al crecimiento de *R. nigricans* se observó que la agitación es un factor importante, en general el hongo creció más, entre 2.1 a 2.4 mg biomasa/ml, cuando los cultivos estuvieron con 125 rpm de agitación que con la agitación de 65 rpm (1.4 – 1.8 mg biomasa/ml) a las 48 h independientemente de la relación C/N. Con ambas relaciones C/N a las 140 h se observó una ligera disminución de la biomasa con respecto a los resultados obtenidos a las 48 h, esto es debido al efecto tóxico que presenta el PCF sobre el microorganismo.

Con estos resultados se puede decir que *R. nigricans* no necesita de limitación de nitrógeno como *P. chrysosporium* para llevar a cabo la degradación de PCF. Con valores de pH neutros y con mayor transferencia de oxígeno *R. nigricans* es más eficiente en la degradación de PCF. *R. nigricans* no necesita estar limitado en nitrógeno para producir las enzimas que llevan a cabo la degradación del PCF y estas enzimas a su vez necesitan suficiente oxígeno y rangos de pH neutros para tener su mayor actividad.

9.2 IDENTIFICACIÓN DE LA(S) ENZIMA(S) QUE INTERVIENE EN LA DEGRADACION DEL PENTACLOROFENOL EN CULTIVO SUMERGIDO CON *R. nigricans*.

9.2.1 Pruebas cualitativas para determinar la presencia de peroxidasas y fenoloxidasas producidas por *R. nigricans*.

Para confirmar si *R. nigricans* es capaz de producir fenoloxidasas o peroxidasas se hicieron pruebas cualitativas en placa utilizando diferentes sustratos (siringaldazina, p-cresol, ácido tánico). Estos sustratos pueden ser degradados por las enzimas excretadas por el hongo produciendo halos coloridos alrededor del micelio (Seigle-Murandi y col., 1993; Thompson y Cannon, 1984). Se prepararon placas de EMA 2%, PDA y medio Melin-Norkrans (MN) no limitado en N₂. A cada placa se le adicionó uno de los sustratos mencionados anteriormente. Las placas se inocularon con un cilindro de agar con micelio de *R. nigricans* y se incubaron por 10 días a 30°C, se hicieron observaciones cada 12 h. Todos los experimentos se hicieron por triplicado con sus respectivos controles, los cuales estuvieron bajo las mismas condiciones solamente que no se les agregó ninguno de los sustratos de prueba. La reacción se midió de manera cualitativa ya que se asignaron signos positivos (+) según los diferentes grados de intensidad del pigmento producidos en el micelio y donde no hubo reacción se asignó un signo negativos (-).

Se utilizaron como controles positivos para desarrollar la reacción diferentes hongos filamentosos de los cuales ya se han identificado algunas de sus enzimas. Estos hongos se inocularon en placas de PDA. *P. chrysosporium* se utilizó para identificar LiP, este hongo presentó una coloración café clara (++) agregando como sustrato la siringaldazina más H₂O₂, esta coloración se presentó aproximadamente 6h después de agregar el H₂O₂. *T. versicolor* y *P. ostreatus* se utilizaron como controles positivo para la producción de lacasa utilizando como sustrato la siringaldazina, la reacción con estos hongos fue muy intensa ya que se presentó una

coloración café (+++++) inmediatamente después de que se inocularon las placas (aprox. a los 3 min). Estas mismas pruebas se hicieron con *R. nigricans* en PDA, EMA 2% y MN, en los cuales las pruebas resultaron negativas, lo que indica que *R. nigricans* probablemente no excrete al medio LiP ni lacasa, estos resultados no descartan la posibilidad de que el hongo produzca estas enzimas ya que estas pruebas solamente son para enzimas extracelulares, Nagarathanamma y Bajpai, 1999 encontraron actividad de Mn-P y lacasa intracelularmente en una cepa de *R. oryzae*.

Se han hecho estudios con este tipo de pruebas cualitativas probando algunos zigomicetos y han encontrado que estos producen fenoloxidasas extracelulares. Thompson y Cannon (1984) encontraron actividad de fenoloxidasas en 10 especies de *Rhizopus* y 4 de *Mucor* usando ácido tánico.

Los resultados obtenidos en placa para observar la producción de tirosinasas o lacasas por *R. nigricans* utilizando como sustrato ácido tánico y p-cresol se muestran en la tabla 6. En las placas de PDA la pigmentación del micelio fue muy ligera tanto con ácido tánico y p-cresol en comparación con los otros dos medio de cultivo probados. En las placas de este mismo medio con ácido tánico y tirosina la coloración se presentó a los 6 días de incubación y en las placas con p-cresol se presentó a los 8 días. Las placas de PDA con tirosina y p-cresol presentaron la mayor pigmentación.

Con lo que respecta a las placas con EMA la pigmentación se presentó hasta los 9 días de incubación. La mayor coloración del micelio se presentó en las placas que contenía tirosina y PCF. Con el p-cresol se obtuvieron coloraciones más intensas que con el ácido tánico. En los controles no se apreció ninguna coloración, a excepción del control que contenía PCF y tirosina, donde se obtuvo una muy ligera pigmentación alrededor del micelio.

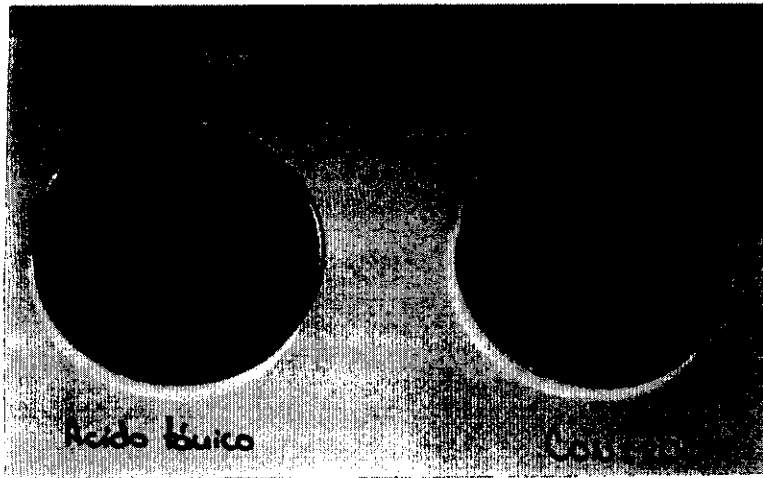
En las placas con medio MN a los 4 días de incubación se presentó la mayor producción de fenoloxidasas. En las placas con este medio y que contenían tirosina y ácido tánico la pigmentación fue muy intensa. En los controles (sin ácido tánico) se encontró un ligero halo colorido, esto puede ser un indicio de que el hongo está produciendo alguna tirosinasa ya que la presencia de la tirosina en el medio de cultivo también sirve como sustrato para identificar este tipo de enzimas (Seigle-Murandi, 1993; Marr y col., 1986). Estos resultados demuestran que *R. nigricans* no necesita de limitación de N₂ para producir fenoloxidasas, ya que en PDA la expresión de estas fue muy baja y este medio no es tan rico en fuente de N₂, como el EMA y MN en los cuales se obtuvo una mayor expresión de las fenoloxidasas. En la figura 8 se observan las placas donde se presentó la mayor pigmentación.

Probablemente la adición de tirosina en el medio de cultivo esté actuando como un inductor de las fenoloxidasas más específicamente de alguna tirosinasa. El PCF también puede estar actuando como un inductor para la producción de estas enzimas ya que en los medios que contienen este tóxico también se obtuvo una pigmentación notable. La degradación de PCF por *R. nigricans* se lleva a cabo probablemente por las fenoloxidasas que produce.

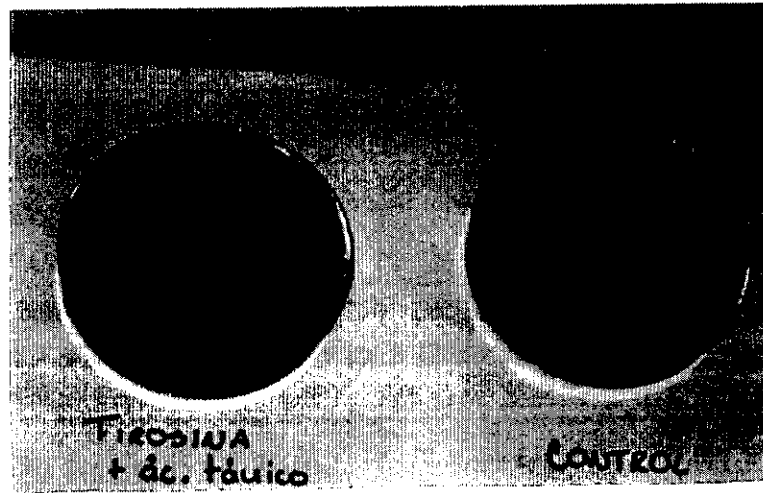
Tabla 6. Actividad relativa de fenoloxidasas extracelulares en medio sólido producidas por *R. nigricans*.

| Sustrato | PDA | | | | EMA 2% | | | | Melin-Norkrans | | | |
|--------------|-----|------|------|--------------|--------|------|------|--------------|----------------|------|------|--------------|
| | PDA | +PCF | +Tir | +Tir +PCF | EMA | +PCF | +Tir | +Tir +PCF | MN | +PCF | +Tir | +Tir +PCF |
| Ácido Tánico | - | - | + | + | - | + | + | ++ | + | +++ | ++++ | +++ |
| Control | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | ++ | ++ |
| p-cresol | + | + | ++ | ++ | - | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| Control | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | ++ | + |

Reacción de intensidad relativa. Los símbolos +, ++, +++ y ++++ fueron empleados para denotar las cantidades relativas de actividad enzimática basadas sobre la intensidad de color. El símbolo - denota la ausencia de producción de enzimas.



B)



C)

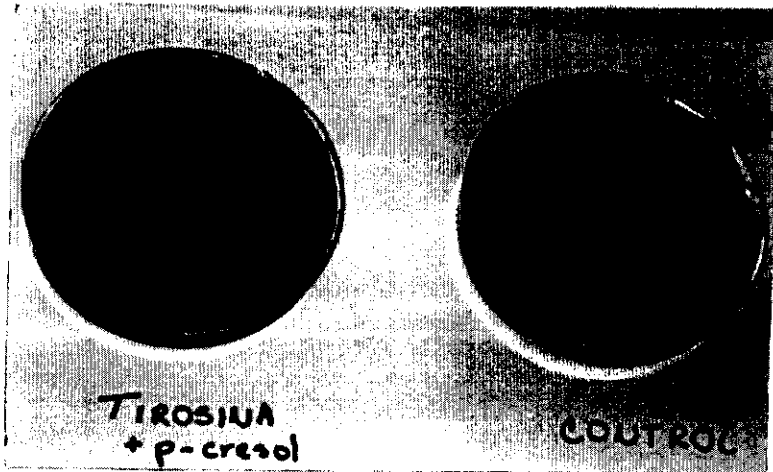


Figura 8. Placas con medio Melin-Norkrans inoculadas con *R. nigricans* para pruebas cualitativas utilizando como sustratos para las enzimas al p-cresol y ácido tánico. A) Placa con ácido tánico y control sin ácido tánico. B) Placas con tirosina y ácido tánico y control sin ácido tánico. C) Placas con tirosina y p-cresol y control sin p-cresol.

9.2.2 Cuantificación de la actividad enzimática de lignina peroxidasa en cultivo sumergido de *R. nigricans* con PCF.

Debido a que no se encontraron pigmentaciones en las placas con siringaldazina y H_2O_2 en la prueba cualitativa par determinar la presencia de peroxidadas extracelulares (LiP) y para confirmar la ausencia de LiP extracelular producida por *R. nigricans* se realizaron experimentos midiendo la actividad enzimática de LiP. Se prepararon cultivos sumergidos con PCF (12.5 ppm) inoculados con esporas de *R. nigricans*. El PCF (12.5 ppm) se adicionó a las 48 h de iniciado el cultivo, se incubaron a 30°C con una agitación de 125 rpm. Se tomaron muestras después de inocular, a las 48h (después de la adición del PCF), 120 y 168 h después de iniciado el cultivo. Se tomaron a estos tiempos debido a que en cultivos anteriores se observó que el PCF comienza a desaparecer después de las 120h de iniciado el cultivo y a las 168 h se lleva acabo la máxima degradación (64%). Se realizaron los siguientes análisis a todas las muestras: pH, biomasa, actividad enzimática por la técnica de la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído (Tien y col., 1988) y degradación de PCF por HPLC.

Tabla 7. Actividad enzimática de LiP en extractos de cultivo sumergido de *R. nigricans* con PCF (12.5 ppm)

| Tiempo (h) | muestra | pH | X (mg/ml) | PCF residual (mg/l) | Degradación (%) | Actividad | |
|------------|---------|------|-----------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | | | | U/L | U/mg X |
| 0 | Control | 5.98 | 0.67 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | Sin PCF | 5.64 | 2.65 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Con PCF | 5.68 | 2.59 | 12.87 | 0 | 1.20×10^{-6} | 6.97×10^{-8} |
| 120 | Sin PCF | 5.59 | 3.11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Con PCF | 5.96 | 1.66 | 8.10 | 35.2 | 2.61×10^{-6} | 2.36×10^{-7} |
| 168 | Sin PCF | 5.74 | 3.30 | 0 | 0 | 1.2×10^{-6} | 5.47×10^{-8} |
| | Con PCF | 5.85 | 2.13 | 5.60 | 64 | 1.5×10^{-6} | 1.03×10^{-8} |

U/L = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ de medio

U/mg X = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de biomasa producida

9.2.2 Cuantificación de la actividad enzimática de lignina peroxidasa en cultivo sumergido de *R. nigricans* con PCF.

Debido a que no se encontraron pigmentaciones en las placas con siringaldazina y H_2O_2 en la prueba cualitativa par determinar la presencia de peroxidases extracelulares (LiP) y para confirmar la ausencia de LiP extracelular producida por *R. nigricans* se realizaron experimentos midiendo la actividad enzimática de LiP. Se prepararon cultivos sumergidos con PCF (12.5 ppm) inoculados con esporas de *R. nigricans*. El PCF (12.5 ppm) se adicionó a las 48 h de iniciado el cultivo, se incubaron a 30°C con una agitación de 125 rpm. Se tomaron muestras después de inocular, a las 48h (después de la adición del PCF), 120 y 168 h después de iniciado el cultivo. Se tomaron a estos tiempos debido a que en cultivos anteriores se observó que el PCF comienza a desaparecer después de las 120h de iniciado el cultivo y a las 168 h se lleva acabo la máxima degradación (64%). Se realizaron los siguientes análisis a todas las muestras: pH, biomasa, actividad enzimática por la técnica de la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído (Tien y col., 1988) y degradación de PCF por HPLC.

Tabla 7. Actividad enzimática de LiP en extractos de cultivo sumergido de *R. nigricans* con PCF (12.5 ppm)

| Tiempo (h) | muestra | pH | X (mg/ml) | PCF residual (mg/l) | Degradación (%) | Actividad | |
|------------|---------|------|-----------|---------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | | | | U/L | U/mg X |
| 0 | Control | 5.98 | 0.67 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 48 | Sin PCF | 5.64 | 2.65 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Con PCF | 5.68 | 2.59 | 12.87 | 0 | 1.20×10^{-6} | 6.97×10^{-8} |
| 120 | Sin PCF | 5.59 | 3.11 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Con PCF | 5.96 | 1.66 | 8.10 | 35.2 | 2.61×10^{-6} | 2.36×10^{-7} |
| 168 | Sin PCF | 5.74 | 3.30 | 0 | 0 | 1.2×10^{-6} | 5.47×10^{-8} |
| | Con PCF | 5.85 | 2.13 | 5.60 | 64 | 1.5×10^{-6} | 1.03×10^{-8} |

U/L = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ de medio

U/mg X = $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de biomasa producida

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos del crecimiento de *R. nigricans*, la degradación de PCF y la actividad enzimática de LiP. Los matraces que contenían PCF presentaron un cambio máximo en la absorbancia de 0.0014/min a las 120 h debido a la presencia de LiP. Este cambio corresponde a una actividad de LiP de 2.36×10^{-7} U/mg de biomasa producida. En los controles (sin PCF) se observó un cambio máximo de absorbancia de 0.0006/min a las 168 h debido a la presencia de la LiP lo que corresponde a una actividad de 5.47×10^{-8} U/mg de biomasa producida. Comparando estos resultados con los que se obtuvieron con *P. chrysosporium* en cultivos sumergidos con 12.5 ppm de PCF, se observó que la actividad registrada por *R. nigricans* es muy pequeña en relación con la que presentó *P. chrysosporium*. Este hongo presentó un cambio máximo en la absorbancia de 0.0097/min con una actividad máxima de 4.62×10^{-3} U/mg de biomasa producida y en el control (sin PCF) se obtuvo una absorbancia máxima de 0.0006/min dando una actividad máxima de 1.96×10^{-4} U/mg de biomasa producida. *R. nigricans* produce una cantidad mínima de la enzima LiP. Los resultados obtenidos con *R. nigricans* también demuestran que la presencia de PCF permite que el hongo produzca antes la LiP, ya que se detectó esta enzima desde las 48h en estos cultivos, mientras que en los controles (sin PCF) la enzima se detectó hasta las 168 h, otro dato importante que se obtuvo fue que la actividad de LiP se incrementó por la presencia del PCF en el medio ya que a las 120 h se obtuvo la máxima actividad en estos cultivos. En cultivo sumergido con PCF e inoculados con esporas de *P. chrysosporium* se observó que también el PCF induce la producción de LiP (Tomasini y Cortés, 1998).

En trabajos recientes se ha encontrado que *Rhizopus oryzae* es capaz de decolorar un efluente Kraft y estos autores no encontraron actividad de LiP (Nagarathnamma y col., 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran, que probablemente la LiP no es la enzima principal encargada de la degradación del PCF por *R. nigricans*.

Con lo que respecta al pH se mantuvo constante hasta el final del cultivo tanto en los controles como en los matraces que contenían PCF. En los controles sin PCF se observó la mayor cantidad de biomasa durante todo el cultivo, en cambio, en los cultivos con PCF se presentó una disminución notable ya que a las 168 h se produjo 1.5 veces menos biomasa con respecto al control, esto es debido al efecto tóxico que presenta el PCF sobre el microorganismo.

9.2.3 Degradación del PCF por *R. nigricans* en cultivo sumergido con tirosina.

Los resultados anteriores mostraron que la LiP no es la enzima que produce *R. nigricans* para llevar a cabo la degradación de PCF. Se plantearon nuevos experimentos para tratar de identificar alguna(s) de las enzimas producidas por *R. nigricans* involucradas en la degradación del PCF. En algunos trabajos se ha reportado que la oxidación de fenol puede ser catalizada por varias enzimas que incluyen a las peroxidasas y fenoloxidasas (lacasa y tirosinasa) (Aitken y col., 1994 y Leyva y col., 1996). Las fenoloxidasas son un grupo de enzimas extracelulares involucradas también con la degradación de PCF y clorofenoles, este tipo de enzimas son secretadas por otras especies de hongos como *Fusarium sp* que es capaz de degradar PCF solo si hay tirosina en el medio de cultivo, esta degradación parece ser mediada por una tirosinasa (Kwasniewska, 1981). *Trametes versicolor* produce lacasa, que es una enzima extracelular, la cual cataliza la degradación de clorofenoles (Roy-Arcand y col., 1991). Algunos investigadores han reportado que los zigomicetos producen fenoloxidasas extracelulares, entre los que figuran como más altos productores de estas enzimas se encuentran los hongos del género *Rhizopus* (Thompson y col, 1984 y Seigle-Murandi y col., 1992). También se ha encontrado que algunos zigomicetos son capaces de degradar PCF con altas tasas y reportan que los zigomicetos son más eficientes que los basidiomicetos (Seigle-Murandi y col., 1991 y 1993).

Debido a que las pruebas cualitativas realizadas mostraron la producción de fenoloxidasas por *R. nigricans* se plantearon experimentos en cultivo sumergido adicionando tirosina en el medio para observar si este sustrato induce la producción de tirosinasas y por lo tanto se incrementa la degradación del PCF. Se prepararon matraces por duplicado con medio Melin-Norkrans con tirosina. Se probaron 3 concentraciones diferentes de tirosina (0.08, 0.13 y 0.26 g/l de medio). Los matraces se inocularon con esporas de *R. nigricans* y a las 48 h de iniciado el cultivo se adicionó el PCF. Se prepararon controles para cada una de las concentraciones de tirosina probadas, el primero, sin PCF e inoculado con esporas del hongo para observar el crecimiento del microorganismo; el segundo con PCF y sin inocular para observar si no se presentaba degradación abiótica del tóxico y si la presencia de la tirosina en el medio no interfería con la técnica utilizada para cuantificar el PCF. También se prepararon otros dos controles ambos inoculados pero ahora sin tirosina; la diferencia entre ellos fue que uno contenía PCF para medir el porcentaje de degradación y el otro sin PCF para comparar el efecto de la tirosina sobre el crecimiento. Todos los diferentes cultivos se incubaron a 30°C con una agitación de 125 rpm. Se tomaron muestras al tiempo inicial (momento de inocular), 48, 96 y 168 h. A las muestras tomadas se le realizaron los siguientes análisis: pH, biomasa y degradación de PCF.

En la figura 9 se muestra el crecimiento de *R. nigricans* en cultivo sumergido con las tres concentraciones diferentes de tirosina junto con sus respectivos controles (sin PCF y su respectiva concentración de tirosina) los cuales sirvieron para observar y comparar los perfiles de crecimiento. En los cultivos con PCF se presentó una disminución en la producción de biomasa después de la adición del tóxico (48 h). Al final de la cinética (168 h) en estos cultivos se produjo 1.18 veces menos biomasa con respecto a sus respectivos controles, esto es debe probablemente al efecto tóxico que presenta el PCF sobre el microorganismo. En los controles sin tirosina con y sin PCF a las 168 h se obtuvieron cantidades de biomasa de 3.52 y

3.01mg/ml respectivamente y también hubo una disminución en la biomasa en los cultivos con PCF y sin tirosina, siendo la biomasa 1.17 veces menos con respecto a los cultivos sin el tóxico. Estos valores son muy similares a los obtenidos en los cultivos con tirosina, lo cual indica que, la presencia de la tirosina en el medio de cultivo no presentó ningún efecto sobre el crecimiento, pero el PCF siguió presentando el mismo efecto tóxico sobre el hongo.

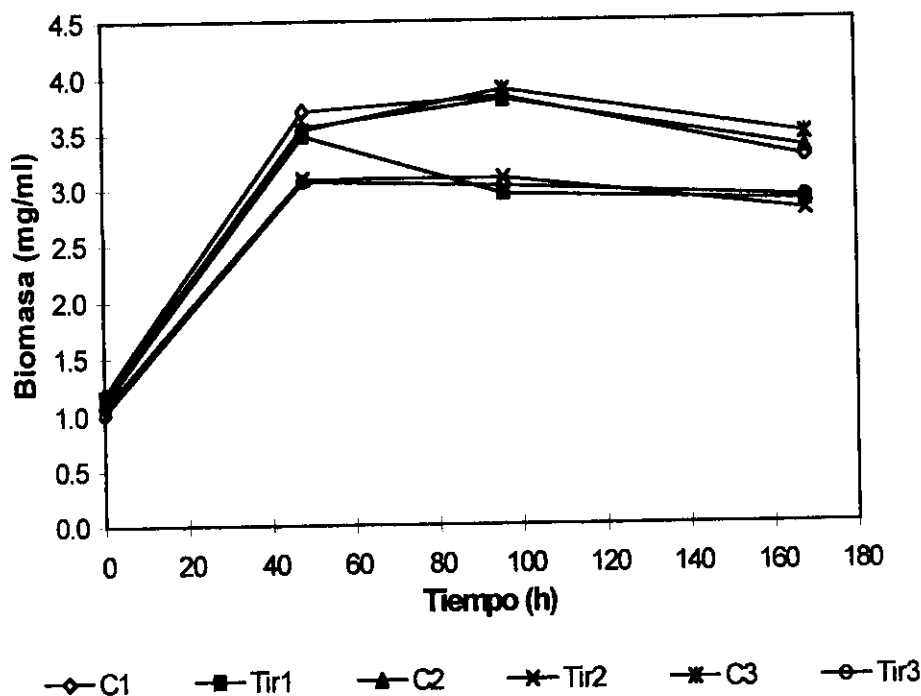


Figura 9. Cinética de crecimiento de *R. nigricans* en cultivo sumergido con PCF (12.5 ppm) y diferentes concentraciones de tirosina. Tir1(0.08 g/l), Tir2 (0.13 g/l) y Tir3 (0.26 g/l) con sus respectivos controles (sin PCF) representados por C para cada una de las concentraciones de tirosina.

Con lo que respecta al perfil de pH, la mayor disminución se observó antes de las 48 h (en un rango de 4.2-4.5), esta notable disminución probablemente se debió a que el hongo se encontraba en la fase de crecimiento consumiendo la fuente de carbono de fácil asimilación y gran parte de los nutrientes del medio para obtener la energía necesaria para llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Estos resultados se

respaldan con el perfil de crecimiento de la figura 9, donde se observó que la máxima velocidad de crecimiento del hongo se llevó a cabo antes de las 48 h. Después de la adición del PCF el pH se mantuvo constante y a las 168 h en los cultivos con PCF hubo un ligero aumento con respecto a los controles es probable que este incremento se deba a los productos generados por el hongo al metabolizar el PCF.

En la figura 10 se muestra el perfil de desaparición del PCF de los cultivos con diferentes concentraciones de tirosina junto con un control sin inóculo y que se utilizó para observar si el PCF no presentaba degradación abiótica y si la presencia de tirosina en el medio no interfería con la técnica de extracción del PCF, lo cual no sucedió, ya que como se muestra en la figura 10, se recuperó todo el PCF adicionado al cultivo. El PCF residual obtenido a las 168 h de cultivo con las concentraciones de tirosina de 0.08, 0.13 y 0.26 g/l fueron de 3.61, 2.17 y 4.87 mg/l respectivamente. Las dos primeras concentraciones probadas mostraron cantidades de PCF residual menores al tiempo final que las obtenidas en cultivos sin tirosina ya que en estos cultivos el PCF residual encontrado fue de 4.75 mg/l, sin embargo, la concentración de 0.26 g/l de tirosina en el medio fue diferente ya que se encontró mayor cantidad de PCF residual al tiempo final en comparación con el control sin tirosina, esto probablemente se deba a la inhibición de la enzima por sustrato.

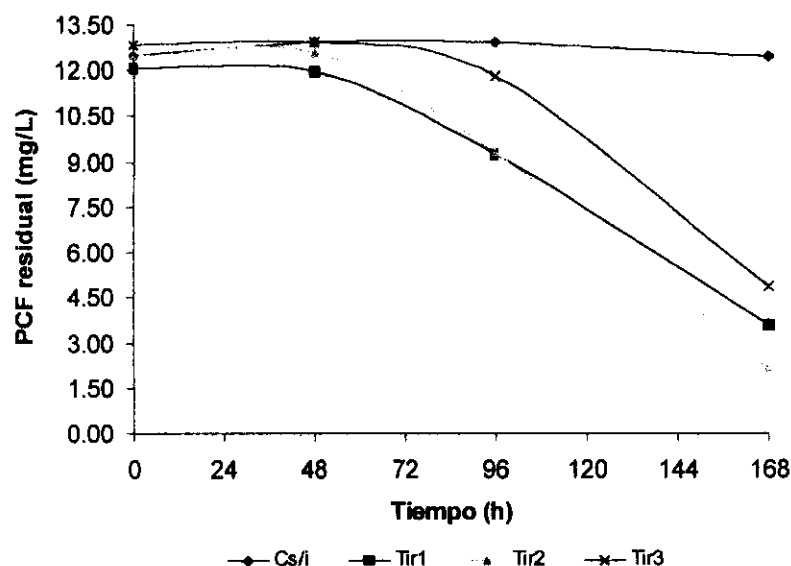


Figura 10. Disminución de PCF en cultivo sumergido con tirosina y PCF (12.5 ppm) por *R. nigricans*. Cs/i (control sin inóculo con PCF); Tir1(0.08 g/l), Tir2 (0.13 g/l) y Tir3 (0.26 g/l).

Debido a los resultados anteriores se decidió probar una nueva concentración de tirosina intermedia a las dos últimas para observar si se aumentaba un poco más la degradación. La concentración nueva que se probó fue 0.195 g/l de tirosina, estos experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones arriba mencionadas. La tabla 8 muestra la biomasa producida, el porcentaje de PCF degradado y la eficiencia de degradación de *R. nigricans* a las 168 h con las cuatro diferentes concentraciones de tirosina. Estos resultados mostraron que con la concentración de 0.195 g/L de tirosina se obtuvo 3.18 mg/L de PCF residual, esto corresponde al 74.5% de degradación, mientras que con la concentración de 0.13 g/L, fue de 2.37 mg/L de PCF residual equivalente al 81%. Estos resultados indican que con la concentración de 0.195 g/L ya se presenta una inhibición de la enzima probablemente por el sustrato, al igual que 0.26 g/L de tirosina en el medio. Con la concentración de 0.13 g/L de tirosina en el medio de cultivo se obtuvo la mayor tasa específica de degradación de $0.022 \text{ mg PCF} \cdot \text{mg de biomasa}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

En los cultivos sin tirosina y con la misma concentración de PCF se obtuvo una eficiencia de 0.015 mg PCF·mg biomasa⁻¹·h⁻¹ (62%). Los resultados obtenidos hacen suponer que la degradación de PCF por *R. nigricans* se lleva a cabo por sistemas enzimáticos compuesto de tirosinasas. La presencia de tirosina en el medio probablemente este induciendo la producción de la tirosinasa, la cual probablemente este catalizando la oxidación del PCF.

La disminución de la biomasa es debida al efecto tóxico que produce el PCF al hongo, la presencia de la tirosina no afecta el crecimiento ya que en cultivos control que contenían tirosina sin PCF a las 168 h presentó un crecimiento de 3.34 mg de biomasa/mL y en los controles sin tirosina y sin PCF la biomasa producida al mismo tiempo fue de 3.42 mg de biomasa/mL. (Tabla 8)

Tabla 8. Resultados de biomasa y degradación de PCF a las 168 h de un cultivo sumergido de *R. nigricans* con 4 concentraciones diferentes de tirosina y PCF (12.5 ppm adicionado a las 48h de iniciado el cultivo).

| Muestra | Tir 1 (0.08 g/L) | Tir 2 (0.13 g/L) | Tir 3 (0.195 g/L) | Tir 4 (0.26 g/L) | Control A | Control B | Control C |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| Biomasa (mg/mL) | 2.89 | 2.79 | 2.84 | 2.86 | 3.012 | 3.42 | 3.34 |
| Degradación (%) | 69 | 81 | 74.5 | 61 | 62 | 0 | 0 |
| Eficiencia (mg PCF/mg X h) | 0.018 | 0.022 | 0.019 | 0.016 | 0.015 | 0 | 0 |

*Controles sin tirosina: **A** con PCF y **B** sin PCF ambos inoculados con esporas de *R. nigricans*

*Control **C**: con tirosina sin PCF inoculado con esporas de *R. nigricans*.

9.3. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DEL PCF POR *R. nigricans* EN SFS.

9.3.1 Germinación de las esporas de *R. nigricans* en SFS con PCF.

En los experimentos de fermentación sólida (fig. 6), empleando bagacillo de caña como soporte impregnado con medio sintético Melin-Norkrans concentrado sin limitación de nitrógeno (N₂). El medio se usó concentrado ya que en el cultivo sólido los nutrientes no están en contacto directo con el microorganismo, porque están absorbidos en el bagacillo a diferencia del cultivo sumergido que tienen todos los nutrientes disponibles.

Como ya se mencionó el PCF inhibe la germinación de las esporas de *R. nigricans* (Villareal, 1996; Flores, 2000). Con la finalidad de observar si el PCF también inhibe la germinación de las esporas de *R. nigricans* en el SFS y si el hongo es capaz de degradar el PCF en este sistema se montaron fermentaciones. Se usó medio Melin-Norkrans 2 veces concentrado (2x) bajo las condiciones descritas en la metodología. Se tomaron muestras al tiempo inicial y a las 96 h.

Por observaciones al microscopio se determinó que la germinación de las esporas de *R. nigricans* no se inhibió por la presencia del PCF en el cultivo sólido. En la figura 11a se muestra una micrografía de *R. nigricans* en SFS sin PCF a las 96h. Se puede observar que el hongo se encontraba en la fase de esporulación ya que se ven algunos esporangios formados. En la figura 11b se muestra otra micrografía de *R. nigricans* en el SFS con PCF (12.5 ppm) también a las 96 h. Se observa que el hongo se encuentra en forma de micelio, (a diferencia del control que no contenía PCF). Esto demuestra que la presencia de PCF en el bagazo presenta un efecto tóxico sobre el microorganismo y retrasa el periodo de esporulación.



a)

b)

Figura 10: Observaciones al microscopio a 400x de: a) Micelio de *R. nigricans* en SFS control sin PCF. b) Micelio de *R. nigricans* en SFS con PCF (12.5 ppm). Ambas tomadas a las 96h de cultivo usando bagazo de caña como soporte con medio Melin Norkrans concentrado (2x).

Este resultado presenta varias ventajas ya que en este sistema sería complicado adicionar el PCF después de germinadas las esporas por que se tendría que desempacar toda la columna para poder adicionar el tóxico en forma homogénea a todo el bagazo y la posibilidad de inocular con micelio impediría la distribución del hongo en todo el bagazo debido a su morfología y por lo tanto no habría un crecimiento homogéneo en toda la columna lo que provocaría una mala degradación del PCF. La germinación de las esporas de *R. nigricans* en cultivo sólido posiblemente no se inhibe debido a que el PCF se encuentra absorbido en el bagazo. Esto permite que el hongo no esté en contacto directo con el tóxico, a diferencia del cultivo sumergido donde el PCF está disuelto en el medio líquido y en contacto directo con el hongo.

9.3.2 Estadarización de la técnica de extracción del PCF residual del bagacillo de caña en SFS.

Debido a que el PCF es fuertemente absorbido por el bagazo de caña se tuvo que idear una técnica de extracción de este compuesto para poder realizar la cuantificación total del PCF residual y con certeza decir que el PCF faltante fue degradado por *R. nigricans*.

Se hicieron varias pruebas utilizando agua y buffer de carbonatos (pH 10.7) debido a que en valores de pH altos (desde 8.6) el PCF se encuentra casi solubilizado en su totalidad (Arcand y col., 1995).

La técnica que se eligió consiste de dos etapas:

- 1) Se pesaron 3 g de bagazo fermentado y se agregaron 15 ml de agua, se agitó por 10 min. Inmediatamente después el bagazo fue prensado para obtener el extracto al cual se ajustó el pH a un valor de 11. Se cuantificó el PCF de este extracto por HPLC. En esta primera etapa se recuperó del 5–10% del PCF adicionado.
- 2) el bagazo prensado fue resuspendido en 15 ml de buffer de carbonatos pH 10.7 y se sonicó por 10 min, posteriormente se prensó para obtener el extracto. El PCF se cuantificó también por HPLC. En esta etapa se recuperó del 85-90% del PCF adicionado al cultivo por lo que es necesario hacer los dos pasos para obtener todo el PCF.

9.3.3 Selección de la concentración del medio de cultivo para el crecimiento de *R. nigricans* en SFS.

En los SFS con bagazo es preferible usar medios concentrados para obtener un crecimiento adecuado (Barrios-González y col., 1988). Se probaron diferentes concentraciones de medio de cultivo Melin-Norkrans (2x, 3x, 5x, y 6x) con PCF (12.5 ppm). Se prepararon 2 controles. El primero sin PCF pero inoculado con esporas de *R. nigricans*, para observar si el compuesto tóxico presentaba algún efecto sobre el crecimiento del hongo, el segundo con PCF (12.5 ppm) y sin inóculo para observar si el PCF no presentaba degradación abiótica. Ambos controles sirvieron para probar la técnica de extracción. Se hicieron observaciones al microscopio al momento de inocular el bagazo (tiempo 0), 96 y 168h para observar el crecimiento de *R. nigricans* y se determinó la degradación de PCF por HPLC.

Los resultados mostraron que *R. nigricans* fue capaz de crecer en todas las concentraciones de medio que se probaron, sin diferencias aparentes. En la figura 12a se muestra el bagacillo impregnado con medio 3x y sin PCF al tiempo inicial. Lo que se observa son las esporas del hongo en el bagacillo. En la figura 12b se muestra el bagacillo impregnado con medio 3x y con PCF (12.5 ppm) a las 96h. Se observa el crecimiento de *R. nigricans* en forma de micelio, el cual creció en la superficie y entre las fibrillas del bagacillo. También se observó que en presencia de PCF el hongo no llegó a formar esporangios. En la figura 12c se muestra el bagacillo impregnado también con medio 3x pero sin PCF a las 96 h. Se observa el micelio de *R. nigricans* así como algunos esporangios en la superficie del bagacillo producidos por el crecimiento del hongo. Algo similar ocurrió con las otras concentraciones probadas y debido a que no se apreciaron diferencias aparentes en el crecimiento del hongo solamente se muestran las observaciones hechas con el medio 3x.

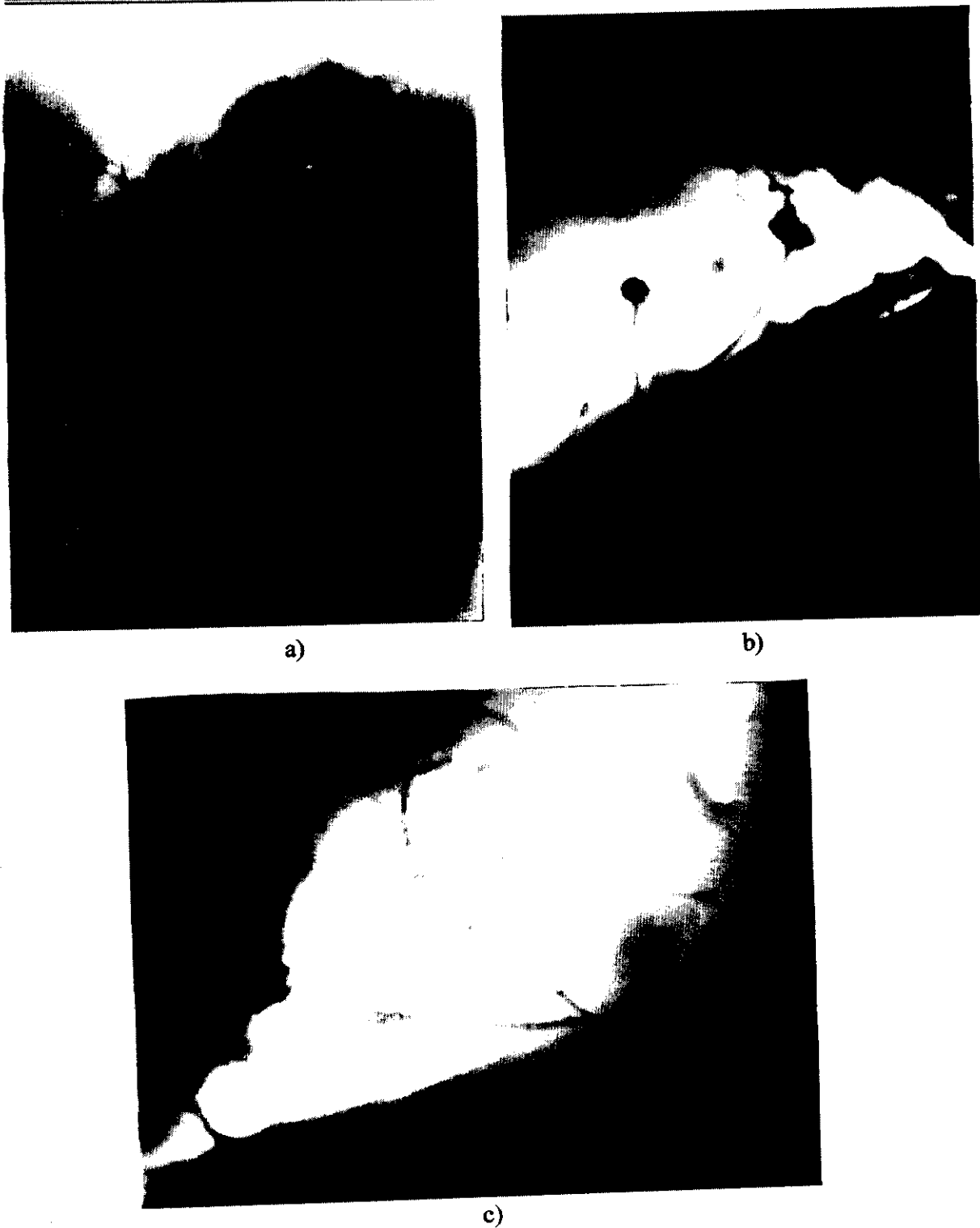


Figura 12: Observaciones al microscopio a 400x del micelio de *R. nigricans* en FS en bagacillo de caña impregnado con medio Melin-Norkrans concentrado 3 veces, incubados a 30°C. a) Sin PCF al tiempo inicial. b) Sin PCF a las 96 h. c) con PCF a las 96 h.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de PCF residual, pH y humedad a las 96 h. Para las columnas que contenían las concentraciones de medio Melin-Norkrans más elevadas, 5x y 6x, la técnica de extracción no fue muy buena ya que se recuperó únicamente el 80 y 62% del PCF respectivamente adicionado. Esta mala extracción probablemente se debió a la gran concentración de nutrientes que se encontraban impregnados en el bagazo los cuales impidieron la fácil liberación del PCF. En los medios menos concentrados (2x y 3x) no se observó este problema, en este caso se recuperó el 100% del PCF adicionado, tanto en las columnas de tiempo inicial como a las 96h. Estos resultados indican que el PCF no sufre degradación abiótica durante la incubación, es decir este persiste en el medio sólido.

En los cultivos con medio 2x y 3x con 12.5 ppm de PCF e inoculados se encontró 1.82 y 1.79 ppm de PCF residual respectivamente a las 96 h de cultivo. Es decir se obtuvo una degradación de PCF del 86%. La cantidad de PCF residual encontrada con el medio 5x fue muy pequeña (0.86 ppm) y con el medio 6x no se encontró PCF; estos dos últimos resultados tiene el error de la técnica de extracción. Para conocer el porcentaje de degradación que presenta el hongo en estos medios se tendrá que resolver el problema de extracción del PCF, haciendo algunas modificaciones a la técnica utilizada en este trabajo, quizá aumentando el tiempo de sonicación o cambiar el buffer por un disolvente con el cual se pueda extraer en su totalidad el PCF.

Tabla 9. Resultados de cultivo sólido con *R. nigricans* a las 96 h de iniciado el cultivo con diferentes concentraciones de medio Melin Norkrans y 12.5 ppm de PCF.

| Medio | Muestra | PCF residual (mg/l) | Degradación (%) | Humedad (%) | pH |
|-------|---------|---------------------|-----------------|-------------|------|
| 2x | A | 12.26 | 0 | 74.6 | 5.47 |
| | B | 0 | 0 | 74.9 | 4.34 |
| | con PCF | 1.82 | 85.4 | 75.2 | 4.26 |
| 3x | A | 12.41 | 0 | 75.0 | 5.42 |
| | B | 0 | 0 | 73.6 | 4.29 |
| | con PCF | 1.79 | 86 | 75.3 | 4.05 |
| 5x | A | 9.96 | 0 | 75.5 | 5.57 |
| | B | 0 | 0 | 71.3 | 3.52 |
| | con PCF | 0.86 | 93.1 | 75.4 | 3.77 |
| 6x | A | 7.74 | 0 | 75.2 | 6.51 |
| | B | 0 | 0 | 76.7 | 3.52 |
| | con PCF | 0 | 100 | 75.3 | 3.56 |

A: control sin inóculo con PCF (12.5 ppm).

B: control con inóculo (1×10^7 esp/g bagazo húmedo) sin PCF.

Con lo que respecta a la humedad, esta se mantuvo casi constante durante todo el cultivo (75 ± 2) en todos los diferentes medios probados. En los cultivos inoculados con y sin PCF de medios 2x y 3x, el pH presentó una disminución de una unidad en la escala de pH con respecto a su correspondiente cultivo control (con PCF sin inóculo), el cual mantuvo el valor de pH constante durante todo el experimento. Con los medios 5x y 6x se obtuvo una disminución mayor ya que para los cultivos inoculados con y sin PCF el valor de pH disminuyó 2 unidades en la escala de pH con respecto a sus controles. Esta variación probablemente se debió a un mayor crecimiento. La disminución en los valores de pH podría deberse a que el buffer de citratos que se adiciono al medio como amortiguando no está funcionando como tal y cabe la posibilidad de que el hongo esté consumiendo el citrato adicionado, debido a que se encuentra en un sistema completamente aeróbico.

Se decidió trabajar con el medio 2x ya que el porcentaje de degradación obtenido con la concentración 3x fue muy similar y considerando esto dentro de un proceso biotecnológico sería conveniente trabajar con un medio menos concentrado para minimizar costos.

9.3.4 Cinética de degradación del PCF por *R. nigricans* en SFS con medio Melin-Norkrans (2x) y 12.5 ppm de PCF.

En todos los experimentos anteriores a este, solo se hicieron análisis al tiempo inicial (momento en que se inoculó el bagazo) y tiempo final (96 h), por lo que después se hicieron cinéticas para observar el comportamiento del hongo a través del tiempo y conocer en que momento se obtiene la máxima degradación de PCF. Se usó el SFS como se describe en la metodología usando la concentración seleccionada de medio Melin-Norkrans 2x con una concentración inicial de PCF de 12.5 ppm. Se tomaron muestras cada 24 h hasta un tiempo final de 96 h, cada tiempo por duplicado. Se hicieron los siguientes análisis cuantitativos: CO₂ producido para medir de forma indirecta el crecimiento del microorganismo a través de la actividad metabólica, humedad, pH y degradación de PCF por *R. nigricans*.

9.3.4.1 Evolución del CO₂ durante el cultivo de *R. nigricans* en SFS.

En la figura 13 se muestra la cinética de producción de CO₂ de *R. nigricans* en cultivo sólido, durante el crecimiento y la degradación de PCF. El CO₂ fue monitoreado cada 12 h.

En el control sin inóculo los valores de CO₂ se mantuvieron prácticamente en cero durante todo el cultivo. Este control permitió comprobar la eficiencia de la esterilización del bagazo. Estos resultados demostraron que no hubo presencia de otros microorganismos, por consiguiente la degradación del PCF en el medio se puede atribuir a *R. nigricans*.

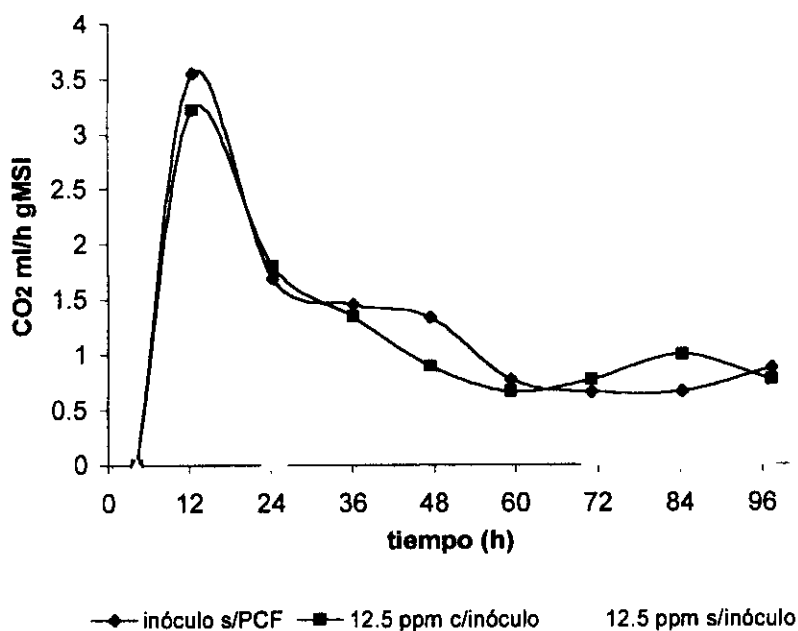


Figura 13. Producción de CO₂ durante el crecimiento de *R. nigricans* en SFS en bagacillo de caña con medio 2x y 12.5 ppm con un flujo de aire de 2.6 l/h e incubado a 30°C por 96 h.

En el cultivo control que no contenía PCF y fue inoculado con esporas del hongo se observó que la producción de CO₂ inició desde las primeras horas, alcanzando su máximo (3.7 ml de CO₂/h gMSI) entre las 15 y 16 h, a partir de ese momento disminuye hasta 0.8 ml CO₂/h gMSI. En los cultivos con PCF el perfil de la producción de CO₂ fue muy similar a la observada en los cultivos sin PCF solo que el valor máximo producido fue ligeramente menor (3.4 ml CO₂/h gMSI). La máxima producción de CO₂ fue también entre las 15 y 16 h pero en este caso el valor máximo fue de 3.2 ml CO₂/h gMSI. La presencia de 12.5 ppm de PCF en este sistema de fermentación no afectó la germinación de las esporas del hongo aunque la fase lag creció un poco menos con PCF con respecto al control, mostró una actividad metabólica parecida en la fase estacionaria (idiofase).

9.3.4.2 Degradación del PCF en SFS por *R. nigricans*.

En la figura 14 se muestra la disminución de la concentración de PCF durante el cultivo de *R. nigricans* en SFS. En los cultivos sin PCF e inoculados con esporas de *R. nigricans* se detectó en las primeras horas, una pequeña cantidad de PCF (1 ppm) el cual desapareció después de las 72 h, la presencia del tóxico en estos controles se debió a que el bagazo contiene trazas de este compuesto. En esta misma gráfica también se observa la disminución de la concentración de PCF en cultivos con PCF inoculados con esporas de *R. nigricans* y sin inocular. En los cultivos sin inocular el PCF se mantiene prácticamente constante ($12.5 \text{ ppm} \pm 0.3$) durante toda la fermentación lo que indica que no hay degradación abiótica del compuesto. Por su parte, en los cultivos inoculados se observa una disminución significativa del tóxico hasta 1.6 ppm al tiempo final de la cinética, 96 h. Esto corresponde a un porcentaje de degradación del 87%. La máxima velocidad de degradación se presentó durante las primeras 24 h, en dicho periodo el PCF disminuyó en un 60% (fase de crecimiento). Es evidente que la degradación está asociada al crecimiento del micelio.

Estos resultados demuestran que en SFS, *R. nigricans* es más eficiente para degradar PCF ya que degrada mayor cantidad en menor tiempo con respecto al cultivo sumergido. En SFS degradó el 87% en 96 h mientras que en cultivo sumergido degradó el 65% en 168 h en cultivos sin tirosina y el 82% en 168h con tirosina.

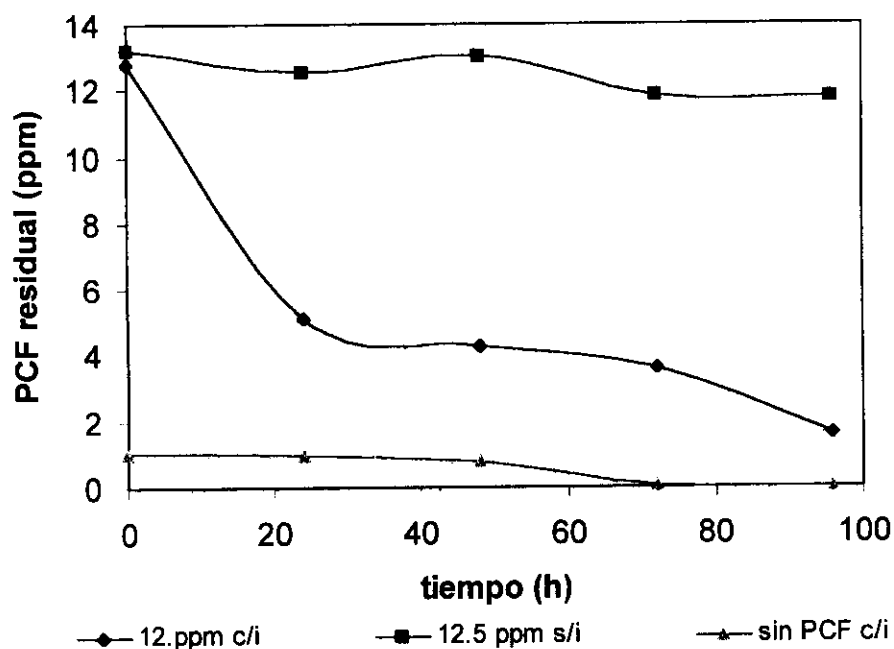


Figura 14. Disminución de la concentración de PCF en los extractos del bagazo de caña inoculado con *R. nigricans* y en los extractos del bagazo de los controles.

9.3.4.3 Monitoreo de pH y Humedad en SFS por *R. nigricans*.

Durante la SFS se registraron los cambios en el contenido de humedad y en el pH del medio (Figura 15). En el cultivo sin inocular el pH se mantuvo constante durante toda la fermentación. Los cultivos inoculados con esporas del hongo presentaron un perfil de pH similar durante toda la cinética. En las primeras 24 h se observa una disminución notable ya que los valores de pH disminuyeron dos unidades y después se mantuvo constante. El cambio más notable de pH se presentó durante las 19 y 21 h de cultivo, el cual coincide con la máxima degradación del PCF y la mayor actividad metabólica del hongo ya que como se mencionó anteriormente estos máximos se obtuvieron entre las 19-22 h. La disminución del pH se debe a la actividad metabólica del hongo y probablemente a los intermediarios formados de la degradación del PCF. Con lo que respecta a la humedad se mantuvo

constante en todos los tratamientos, presentando la máxima disminución a las 96h ($73 \pm 0.5\%$) para todos los tratamientos.

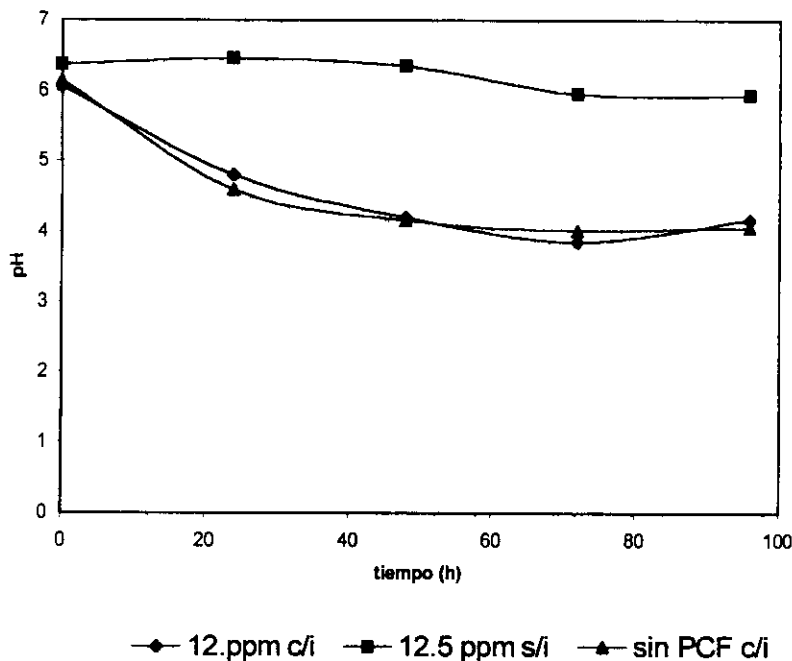


Figura 15. Cambios registrados en el pH durante la cinética de degradación de PCF por *R. nigricans* en cultivo sólido.

9.4 DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA TOLERANCIA AL PCF POR *R. nigricans* EN SFS.

Debido a que se obtuvo un porcentaje elevado de degradación de PCF por *R. nigricans* utilizando una concentración inicial de 12.5 ppm del tóxico en SFS se decidió aumentar la concentración de PCF para observar por un lado si la germinación de las esporas no se inhibe con mayor concentración de este compuesto

y por otro determinar la tolerancia al PCF por *R. nigricans* en este sistema de fermentación.

Para este experimento se probaron concentraciones de PCF de 25, 50 y 100 ppm en cultivo sólido inoculado con esporas de *R. nigricans*. Se incubaron a 30°C por 96 h, se midió la actividad metabólica por respirometría (producción de CO₂) y se hicieron observaciones al microscopio para observar la germinación de las esporas del hongo.

9.4.1 Actividad metabólica de *R. nigricans* utilizando 25 ppm de PCF de concentración inicial en SFS.

En la figura 16 se muestra el CO₂ producido por *R. nigricans* en cultivo sólido en presencia de 25 ppm de PCF inicial. El CO₂ fue monitoreado cada 12 h durante 96h. En el control sin inóculo no se detectó actividad metabólica, este resultado confirmó que no hubo presencia de otros microorganismos. En el control que no contenía PCF y fue inoculado con esporas del hongo se observó que la producción de CO₂ (3.4 ml CO₂/h gMSI) se presentó durante las primeras horas 14-15 h, este comportamiento fue similar al experimento realizado con 12.5 ppm de PCF. En presencia de 25 ppm de PCF, la actividad metabólica del hongo también inició desde las primeras horas de cultivo y la máxima producción de CO₂ (3.2 ml/h gMSI) fue entre las 14 y 15 h, al igual que el cultivo control (sin PCF). Estos resultados indican que no hubo inhibición de la germinación de las esporas por la presencia de 25 ppm de PCF. La presencia de 25 ppm de PCF en este sistema de fermentación no afectó la germinación de las esporas y mostró una actividad metabólica parecida en la fase estacionaria (idiofase) con respecto al control. Después de las 15 h, el CO₂ disminuye en ambos cultivos hasta 0.08 mg /h gMSI en las últimas horas de la fermentación.

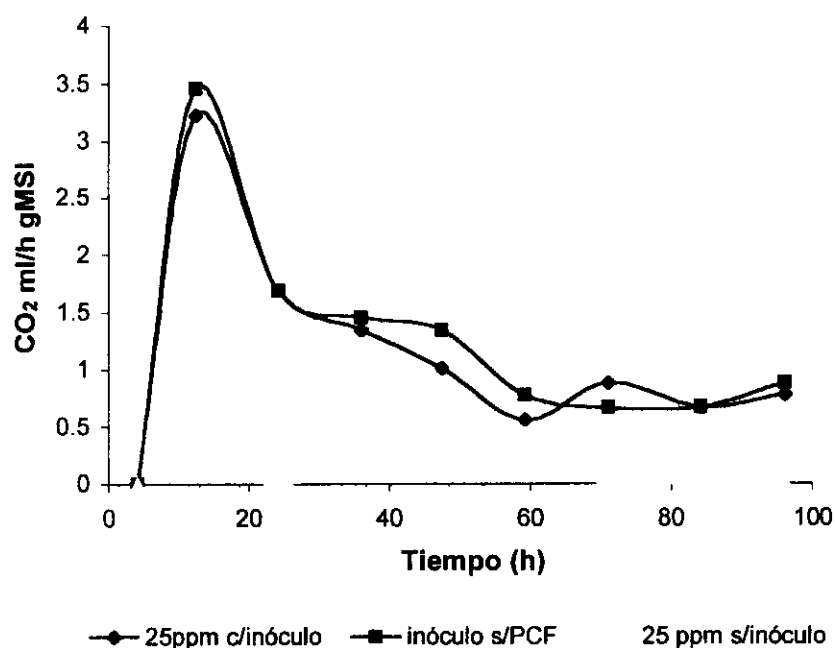


Figura 16. Producción de CO₂ durante la cinética de degradación de PCF por *R. nigricans* en SFS utilizando bagacillo de caña con medio Melin-Norkrans y una concentración inicial de PCF de 25 ppm.

La máxima actividad metabólica obtenida con 25 ppm de PCF (3.2 ml CO₂/h gMSI) resultó muy similar a la obtenida en cultivos con 12.5 ppm de PCF (3.4 ml CO₂/h gMSI), esto demuestra que *R. nigricans* tolera tanto 12.5 como 25 ppm de PCF inicial. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en placa y cultivo sumergido ya que presentó la misma tolerancia (Flores, 2000).

9.4.2 Actividad metabólica de *R. nigricans* utilizando 50 ppm de PCF de concentración inicial en SFS.

En la figura 17 se muestra el CO₂ producido por *R. nigricans* en cultivo sólido en presencia de 50 ppm de PCF inicial. El CO₂ fue monitoreado cada 12 h durante 96h. En el control sin inóculo no se detectó actividad metabólica. En el control que no contenía PCF y fue inoculado con esporas del hongo se observó que la producción de CO₂ (3.2 ml CO₂/h gMSI) se presentó durante las primeras horas 15 h, este comportamiento fue similar a los experimentos realizados con 12.5 y 25 ppm de PCF.

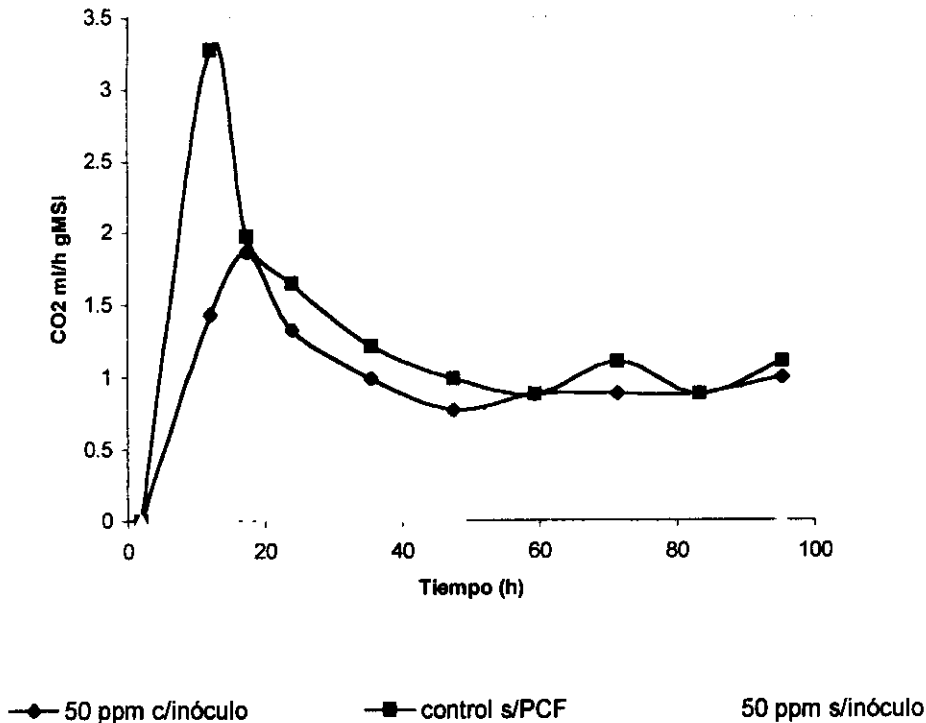


Figura 17. Producción de CO₂ durante la cinética de degradación de PCF por *R. nigricans* en SFS utilizando bagacillo de caña con medio Melin-Norkrans y una concentración inicial de PCF de 50 ppm.

En presencia de 50 ppm de PCF, la actividad metabólica del hongo también inició desde las primeras horas de cultivo y la máxima producción de CO₂ se obtuvo entre las 17-18 h de cultivo poco después que el control, este resultado muestra que la velocidad de crecimiento del hongo se ve afectada por la concentración del PCF ya que la producción máxima de CO₂ fue mucho menor con respecto al control, la cual fue de 1.8 ml CO₂/h gMSI. Después de las 24 h tanto el control como los cultivos con PCF siguen el mismo perfil en la cinética hasta el tiempo final donde ambos alcanzaron una producción de CO₂ de aproximadamente 1.1 ml CO₂/h gMSI.

Estos resultados indican que no hubo inhibición de la germinación de las esporas por la presencia de 50 ppm de PCF pero si se presentó un efecto tóxico del PCF sobre el crecimiento del hongo ya que la producción máxima de CO₂ fue 2 veces menor con respecto al control y a las otras dos concentraciones de PCF (12.5 y 25 ppm) ensayadas.

9.4.3 Actividad metabólica de *R. nigricans* utilizando 100 ppm de PCF de concentración inicial en SFS.

En la figura 18 se muestra el CO₂ producido por *R. nigricans* en cultivo sólido en presencia de 100 ppm de PCF inicial. El CO₂ fue monitoreado cada 12 h durante 96h. En el control sin inóculo no se detectó actividad metabólica. En el control que no contenía PCF y que fue inoculado con esporas del hongo se observó que la máxima producción de CO₂ (3.3 ml CO₂/h gMSI) se presentó durante las primeras horas 15 h.

En presencia de 100 ppm de PCF se observó un fuerte efecto tóxico sobre el crecimiento del hongo. La actividad metabólica del hongo inició también las

primeras horas de cultivo, pero en este caso la velocidad de producción de CO_2 fue menor que la del control, alcanzando la máxima producción (1.6 ml $\text{CO}_2/\text{h gMSI}$) alrededor de las 20 h. Este valor es similar al encontrado para 50 ppm y es 2 veces menor que para 12.5 y 25 ppm de PCF y el control.

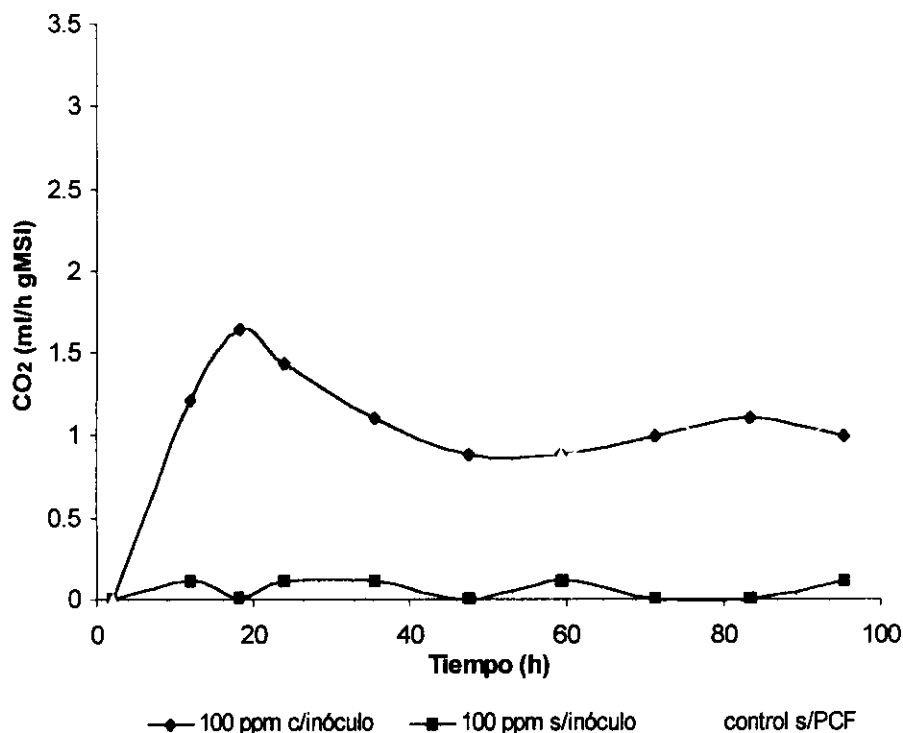
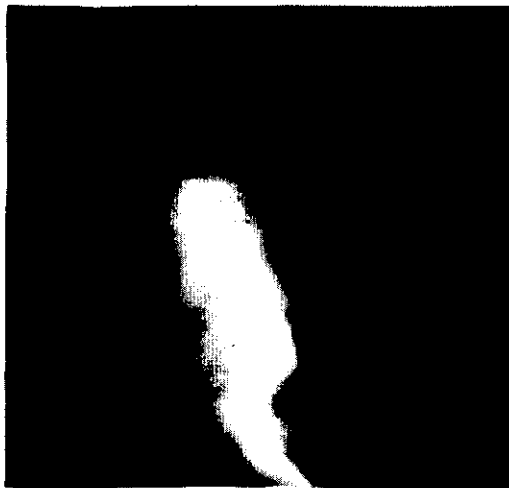


Figura 18. Producción de CO_2 durante la cinética de degradación de PCF por *R. nigricans* en SFS utilizando bagacillo de caña con medio Melin-Norkrans y una concentración inicial de PCF de 100 ppm.

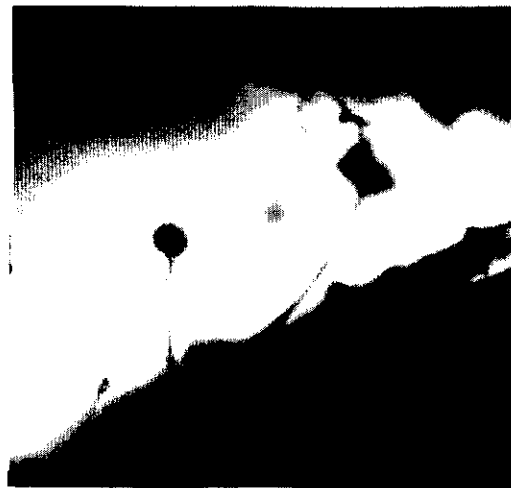
Estos resultados indican que no hubo inhibición total de la germinación de las esporas por la presencia de 100 ppm de PCF pero probablemente se presenta una inhibición parcial ya que la máxima producción de CO_2 se obtuvo después de las 20h a diferencia de las otras concentraciones probadas. La presencia de 100 ppm de PCF en el medio presenta un fuerte efecto tóxico sobre el crecimiento del hongo y retrasa la germinación de las esporas. Tanto en el control sin PCF como en presencia de este el perfil de CO_2 a partir de las 36 h se mantiene muy similar hasta el final de

PCF en el medio presenta un fuerte efecto tóxico sobre el crecimiento del hongo y retrasa la germinación de las esporas. Tanto en el control sin PCF como en presencia de este el perfil de CO₂ a partir de las 36 h se mantiene muy similar hasta el final de la cinética manteniéndose casi constante en estos últimos tiempos ya que la producción de CO₂ al tiempo final para ambos casos fue de 0.99 ml/h gMSI.

En la figura 19 se observa el micelio de *R. nigricans* en SFS para las diferentes concentraciones de PCF probadas al tiempo inicial y a las 96 h. Comparando las muestras del tiempo final (b-f) con la del tiempo inicial (a) donde no se observó micelio, se puede decir que las esporas si germinaron. En presencia de 50 y 100 ppm se observó que el micelio es poco abundante a las 96 h en comparación con el obtenido con las otras dos concentraciones probadas (12.5 y 25 ppm). Estos resultados respaldan a los obtenidos en los perfiles de actividad metabólica ya que la producción de CO₂ es menor cuando la concentración de PCF aumenta, lo cual indica que hay menor crecimiento debido a las altas concentraciones de PCF.



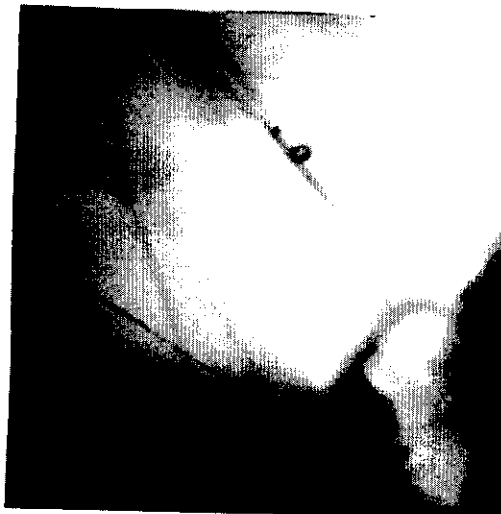
a)



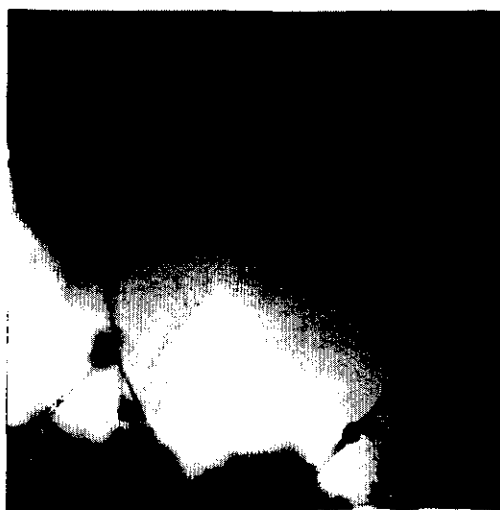
b)



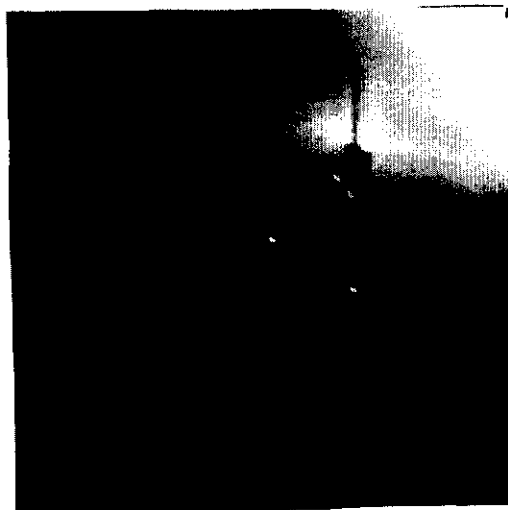
c)



d)



e)



f)

Figura 19. Micrografías de microscopio óptico 400x del micelio de *R. nigricans* en SFS en bagazo de caña con medio Melin-Norkrans (2x). a) inóculo sin PCF al tiempo inicial. b) inóculo sin PCF a las 96 h de cultivo. c) inóculo con 12.5 ppm de PCF. d) inóculo con 25 ppm. e) inóculo con 50 ppm. f) inóculo con 100 ppm. Todas las muestras con PCF se tomaron a las 96 h.

Es importante mencionar que estos resultados muestran un gran potencial de tolerancia de PCF por *R. nigricans* en SFS. Las condiciones de cultivo en este sistema no se han optimizado. El crecimiento de *R. nigricans* sobre el bagacillo fue muy pobre comparado con el crecimiento que presentan otros hongos como el *Penicillium chrysogenum* que presenta un crecimiento muy abundante, el bagacillo inoculado con este hongo se compacta por la presencia del micelio y es notorio a simple vista. La producción máxima de CO₂ determinada para este hongo fue entre 10 y 12 ml/h gMSI a las 30 h de cultivo (Miranda, 1997). Esta tasa es 4 veces mayor que la encontrada para *R. nigricans* (3.6 ml CO₂/h gMSI).

Si comparamos el crecimiento que presentó *R. nigricans* con el de *P. chrysosporium* (que es un basidomiceto de crecimiento lento), las tasas de evolución de CO₂ son parecidas 8 y 10 mg/h gMSI respectivamente solo que *R. nigricans* alcanza este valor máximo a las 15 h y *P. chrysosporium* a los 13 días (Cruz, 2000). Esto indica que si se aumenta el crecimiento de *R. nigricans* en SFS, optimizando las condiciones de cultivo para obtener tasas más altas con las obtenidas con *P. chrysogenum* y *P. chrysosporium* la tolerancia y la eficiencia de degradación de PCF por *R. nigricans* puede incrementarse significativamente.

CONCLUSIONES.

- ◆ Las condiciones ideales para obtener la máxima degradación de PCF por *R. nigricans* en cultivo sumergido son: relación C/N de 18.9, pH de 5.6, temperatura de 30°C y agitación de 125 rpm.
- ◆ *R. nigricans* no necesita de limitación de nitrógeno como *P. chrysosporium* para llevar a cabo la degradación de PCF en cultivo sumergido.
- ◆ La temperatura no presenta un efecto sobre la degradación del PCF por *R. nigricans* en cultivo sumergido según el diseño factorial.
- ◆ *R. nigricans* presenta muy poca actividad de Li-P en cultivo sumergido en presencia de PCF en comparación con la actividad de Li-P en cultivos de *P. chrysosporium*.
- ◆ La tirosina en cultivo sumergido no aumenta la concentración de biomasa solamente aumenta la degradación del PCF.
- ◆ La presencia de tirosina (0.13 g/L) en el medio sirve como inductor para aumentar la producción de la(s) enzima(s) que intervienen en la degradación del PCF provocando un aumento en hasta el 83% el porcentaje de degradación en comparación con cultivos sin tirosina.
- ◆ Probablemente la enzima que es producida por *R. nigricans* y que está encargada de la degradación del PCF sea una tirosinasa.

Conclusiones.

- ◆ La germinación de las esporas de *R. nigricans* no se inhibe por la presencia de PCF en cultivo sólido.

- ◆ En SFS, *R. nigricans* es más eficiente para degradar PCF ya que degrada mayor cantidad en menor tiempo con respecto al cultivo sumergido. En SFS el hongo degradó el 87% en 96 h mientras que en cultivo sumergido degradó el 65% en 168 h en cultivos sin tirosina y el 82% en 168h con tirosina.

- ◆ *R. nigricans* tolera hasta 100 ppm en cultivo sólido (SFS).

- ◆ El empleo de *R. nigricans* en SFS es una alternativa para la degradación de compuestos tóxicos.

XII. PERSPECTIVAS.

Los resultados obtenidos en este estudio podrían utilizarse como base para realizar nuevas investigaciones que amplíen los conocimientos acerca del uso de *R. nigricans* en la degradación de PCF y otros compuestos tóxicos en cultivo sumergido y sólido. Los nuevos estudios que se sugieren son los siguientes:

CULTIVO SUMERGIDO.

- Determinar si efectivamente es una tirosinasa la enzima responsable de la degradación.
- Determinar si la actividad de esta enzima puede inducirse por la presencia de la tirosina en el medio.
- Identificar los intermediarios producidos durante la degradación del PCF por *R. nigricans* en cultivo sumergido.
- Iniciar el mejoramiento genético de *R. nigricans*.

SISTEMA DE FERMENTACIÓN SOLIDA.

- Optimizar las condiciones de cultivo de *R. nigricans* en SFS para obtener un mejor crecimiento y mayor degradación de PCF por este hongo.

Perspectivas.

- Realizar estudios para determinar la degradación de PCF a concentraciones de 25, 50 y 100 ppm de PCF.
- Estandarizar la técnica de extracción de PCF para concentraciones mayores a 50 ppm del tóxico en SFS e identificar los intermediarios formados durante la degradación del PCF en SFS por *R. nigricans*.
- Cuantificar actividad enzimática de las enzimas que produce *R. nigricans* para llevar a cabo la degradación del PCF en SFS en base a los resultados obtenidos en cultivo sumergido.

XI. REFERENCIAS.

- Ahlborg, U.G. and Thunberg, T.M. 1980. Chlorinated phenols: occurrence, toxicity, metabolism and environmental impact. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 7: 1-35.
- Ainsworth, A.M. 1995. Technical information Sheet No. 11: Isolation techniques for basidiomycetes. *W. J. Microb. Biotechnol.* 11:363-366.
- Aitken, M.D. I.J. Massey, T. Chen and P. E. Heck. 1994. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Wat. Res.* 28(9): 1879-1889.
- Alazard D. y M. Raimbault. 1980. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 199-209.
- Arcand, Y., J. Hawari and S.R. Guiot. 1995. Solubility of Pentachlorophenol in aqueous solution: The pH effect. *Wat. Res.* 29(1):131-136.
- ATSDR. 1994. Toxicological profile for pentachlorophenol. U.S. Department of Health & Human Services, USA.
- Barr, D.P. and Aust, S.D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28: 78A-87A.
- Barrios González, J. A. Tomasini, G. Viniegra-González y L. López. 1988. Penicillium production by state fermentation. *Botechnology Lett.*, 10:793-798.
- Barrios, G.J. (1994). Producción de metabolitos secundarios por fermentación sólida. Tesis de Doctorado UNAM.
- Bergbauer, M. y C. Eggert . (1992). Differences in the persistence of various bleachery effluents lignings against attacks by white-rot fungi. *Biotech. Lett.* 14 (9): 869-874.
- Bernal, R. M., Cortés D. V. y Tomasini A. 1999. Determinación de las condiciones de cultivo para la degradación de pentaclorofenol por *Rhizopus nigricans*. Memorias del XX encuentro nacional de la AMIDIQ, Puerto Vallarta, Jal. pp. 49-50.
- Bumpus, J. A., M. Tien, D. Wright, and S. D. Aust. 1985, Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228:1434-1436.

Referencias.

Bumpus, J.A. and S.D. Aust, 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 53:2001-2008.

Comisión Intersecretarial para Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICLOPLAFEST). 1992. Catálogo de plaguicidas. SARH, SEDUE, SSA, SECOFI. México.

Crawford, R.L. and W.W. Mohn. 1985. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. Enzyme Microb. Technol. 7:617-620.

Crosby, D.G. 1981 Environmental Chemistry of Pentachlorophenol. Pure Appl. Chem. 35: 1051-1080.

Cruz, T. 2000. Estudios de la actividad ligninolítica producida por hongos de la pudrición blanca en fermentación en estado sólido. Tesis de Doctorado. CINVESTAV, pp. 77-78.

Cserjesi, A.J. and Johnson, E.L. 1967. The adaptation of fungi to pentachlorophenol and it's biodegradation. Can J. Microb. 13: 1243-1249.

Cserjesi, A.J. and Johnson, E.L. 1971. Methylation of pentachlorophenol by *Tricoderma virgatum*. Can. J. Microb. 18:45-49.

Chaudhry, G.R. and S. Chapalamadugu. 1991. Biodegration of halogenated organic compounds. Microb. Rev. 55: 59-79.

Datta, A., A. Betterman and K. Kirk. (1991). Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1453-1460.

Desmus, J.R. Ratton, S. 1993. Chlorophenols. Encyclopedia of Chemical Technology. 4ª ed. Kirk-Othmer. A Wiley interscience Publication. John Wiles and Sons. New York, USA. 6:156-168.

Eaton, D.D. 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. Enzyme Microb. Technol. 7:194-196.

Edgehill, R.V. and R.K. Finn. 1983. Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1122-1125.

Referencias.

Edgington, S.M. (1994). Environmental Biotechnology. Bio/Technol. 12(12). 1338-1341.

Flores A. Verónica. (2000). Evaluación de la capacidad para tolerar y degradar pentaclorofenol por *R. nigricans*. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-I. México, D.F. México.

Freiter, E.R. 1979. Chlorophenols. Encyclopedia of Chemical Technology. 3^a ed. A Wiley interscience Publication. John Wiles and Sons. New York, USA. 5: 864-872.

Gebefugi, I., H. Parlar and F. Korte. 1979. Occurrence of pentachlorophenol in enclosed environments. Ecol. Environ Saf. 3: 269-300.

Goldberg, I., Pegeg, Y. and Rokem, J.S. 1991. Citric, fumaric and malic acids. In: Goldberg, I. and Williams, R. (Eds.), Biotechnology and Food Ingredients. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 349-374.

Hagglomb, M.M., L. Nohybek, M.S. Salkinoja-Salome. 1988. Degradation and o-Methylation of chlorinated phenolic compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* strains. Environ. Microb. 54:3043-3052.

Harkin, J.M. and Obst, J.R. (1973). Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. Experientia. 29: 381-387.

Higson, F.K. 1991. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 122:11-152.

Ikasari, L. y Mitchell, D.A. 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. W. J. of Microb. and Biotechnol. 10:320-324.

Ishizawa, S., H. Toyoda and T. Mantsuguchi. 1961. Effects of DD, EDB and PCP upon microorganisms and their activities in soil. Part I. Effects on microflora. Soil Plant Food Tokyo. 6: 145-155.

Izaki, K., M. Takahashi, T. Sato, Y. Sasayawa, Y. Sato and C. Furusaka. 1981. Some properties of pentachlorophenol-resistant gram-negative bacteria. Agric. Biol. Chem. 45: 765-767.

Jeffies, T. W., S. Choi, and T. K. Kirk. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 42:290-296.

Referencias.

Juhly, V., I. Witte and W. Butte, 1985. Metabolism of pentachlorophenol to tetrahydroquinones by human liver homogenate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 596-601.

Kilser, L., I. Scheunert, H. Geyer, W. Klein and F. Korte. 1979. Laboratory screening of the volatilization rates of organic chemicals from water and soil. *Chemosphere.* :751-767.

Kirk, T. K., S. Croan, M. Tien, K. E. Murtagh, and R. L. Farrell. 1986. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microbiol. Technol.* 8:27-32.

Kloptfer, W., G. Kaufmann, G. Rippen and H.J. Poremski. 1982. A laboratory method for testing the volatility from aqueous solution: first results and comparison with theory. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 6: 545-559.

Kwasniewska, K. 1981. The degradation of pentachlorophenol by a fungus of *Fusarium sp.* *Trace Subst. Environ. Health.* 15:392-398.

Lamar, R.T. and Dietrich, D.M. 1990. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3093-3100.

Lamar, R.T., Larsen. M.J. and Kirk, T.K. 1990. Sensitivity and degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3519-3526.

Leyva, R., L.E. Serrato, R.M., Gerrero y J. Mendoza. 1996. Descomposición enzimática del fenol en solución acuosa usando tirosinasa. *Avances en Ingeniería Química.* 6(1): 41-45.

Lin, J-E, H.Y. Wang and R.F. Hickey. 1991. Use of coimmobilized biological systems to degrade toxic organic compounds. *Biotech. Bioeng.* 38:273-279.

Losane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiartman, S., Ramakrishna, S.V. 1985. Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7: 258-265.

Marr C.D., Grund, D.W., K.A., Harrison. 1986. The taxonomic potential of laccase and tyrosinase spot test. *Mycologia.* 78(2): 169-184.

Milesky, G. J., J. A. Bumpus, M. A. Jurek and S. D. Aust. 1988. Biodegradation of Pentachlorophenol by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2885-2889.

Referencias.

- Miranda S., L.O., 1997. Efecto de la agitación y adición de nutrientes sobre la producción de penicilina en medio sólido en un fermentador dinámico. Tesis de maestría en Biotecnología. UAM-I
- Moo-Young M., A.R. Moreira y R.P. Tenggerdy. 1983. Principles of solid- substrate fermentation. The filamentous fungi. Fungal technology. Ed. por Smith J.E., Berry D.R., Kristiansen B. London, Edward Arnold Publisher. 4:117-144.
- Mudgett, R.E. 1986. Solid state fermentation. En: Manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain. A.I., Solomon. n.a., editores, American Society for microbiology. Washington, pp. 66-84.
- Nagarathnamma R. and P. Bajpai. 1999. Decolorization and detoxification of extraction-stage effluent from chlorine bleaching of kraft pulp by *Rhizopus oryzae*. Appl. Environ. Microbiol. 65:1078-1082.
- Poggi, H.M., Hernández, R., Rinderkneeth, N. and Calzada, J.F. 1989. Supplemented kraft condensate treatment in high rate anaerobic processes. 44th Purdue industrial waste conference proceedings. 9-11 May. pp. 271-277. Purdue University West Lafayette, Indiana. Lewis Publishers.
- Rawe, J., Krietemeyer, S. and Meagher-Hartzell, E. (1993). Guide for conducting treatability studies under CERCLA: biodegradation remedy selection. EPA/540/R-93/519a. USEPA, ORD, RREL, Cincinnati, OH, USA.
- Reddy, C.A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Curr. Opin. Biotech. 6:320-328.
- Reineke, W. And H-J. Knackmuss. 1988. Microbial degradation of haloaromatics. Ann. Rev. Microbiol. 42:263-287.
- Roy-Arcand, L. and F. S. Archibald. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. Enzyme Microb. Technol. 13:194-202.
- Ruckdeschel, G. and G. Renner. 1986. Effects of pentachlorophenol and some of its known metabolites on fungi. Appl. Environ, Microbiol. 51:1370-1372.
- Ruckdeschel, G., G. Renner and K. Schawars. 1987. Effects of pentachlorophenol and some of its known metabolites of different species of bacteria. Appl. Environ, Microbiol. 62:3890-3893.

Referencias.

Sanglard, D., M. S. A. Leisola, and A. Fiechter. 1986. Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 8:209-212.

Scheck, T., R. Muller, F. Morsberger, M.K. Otto and F. Lingens. 1989. Enzymatic dehalogenation of pentachlorophenol by extracts from *Arthrobacter sp.* Strain ATCC33790. *J. Bacteriol.* 171:5487-5491.

Schwetz, B.A, J.F. Quast, P.A. Keeler, C.G. Humiston and R.J. Kouba. 1978. Results of two-years toxicity and reproduction studies on pentachlorophenol (K.R. Rao Ed.). Plenum, New York. pp. 301-309.

Score, A. J., J.W. Palfreuman and N.A. White. 1997. Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *Internat. Biodeter. & Biodegrad.* 39(2-3): 225-233.

Seigle-Murandi, F., P. Guiraud, R. Steiman, and J.-L. Benoit-Guyod. 1992. Phenoloxidase production and vanillic acid metabolism by zygomycetes. *Microbiologica.* 15: 157-165.

Seigle-Murandi, F., R. Steiman and J.L. Benoit-Guyod. 1990. Biodegradation potential of some micromycetes for pentachlorophenol. *Ecotoxicol. and Environ. Safety.* 21: 290-300.

Seigle-Murandi, F., Steiman, J.L. Benoit-Guyod and P. Guiraud. 1993. Fungal degradation of pentachlorophenol by micromycetes. *J. of Biotechnol.*, 30: 27-35.

Sutherly, G.R.J., A. Khindaria, N. Chung y S.D. Aust. (1995). The effect of manganese on the oxidation of chemical by lignin peroxidase. *Biochemistry.* 34: 12624-12629.

Tam, T.Y. and Trevors J.T. 1981a. Toxicity of pentachlorophenol to *Azotobacter vinelandii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27:230-234.

Tam, T.Y. and Trevors J.T. 1981b. Effects of pentachlorophenol on asymbiotic nitrogen fixation in soil. *Water Air Soil Pollut.* 16: 409-414.

Thompson, D.P. and C. Cannon. 1984. Extracellular phenoloxidase activity in *Rhizopus* and *Mucor* species. *Mycologia.* 76(3): 567-568.

Referencias.

Tien, M. Y. and T. K. Kirk. 1988. Lignin peroxidase of . In Biomass. Part B. Lignin, pectin and Chitin vol.161 of Wood, W. A. and S. T. Kellogg. Methods in Enzymology. Academic Press Inc., United Estates of America. pp. 238-249.

Tomasini C. A. y D. V. Cortés. 1998. Efecto del pentaclorofenol en la actividad enzimática de *Phanerochaete chysosporium*. Memorias del XIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Ixtapa-Zihuatenejo, Gro. pp. 85.

Villareal, H. 1996. Aislamiento y selección de hongos filamentosos capaces de degradar clorofenoles. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Tamaulipas.

World Health Organization (WHO). 1987. Environmental health criteria. Vol. 71. Pentachlorophenol. Finland.

Yu, J. and O.P. Ward. 1994. Studies of factors influencing the biodegradation of pentachlorophenol by a mixed bacterial culture. Int. Biodeter & Biodegrad. Bull. 33:209-221.

XIII. APENDICE

APENDICE A

Solución mineral del medio Kirk.

Para un litro de agua desionizada.

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Acido nitrilotriacético | 5.00 g |
| MnSO ₄ H ₂ O | 0.50 g |
| NaCl | 1.00 g |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 0.10 g |
| CoSO ₄ | 0.10 g |
| ZnSO ₄ | 0.10 g |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 10.00 mg |
| AlK(SO ₄) ₂ | 10.00 mg |
| H ₃ BO ₃ | 10.00 mg |
| NaMoO ₄ | 10.00 mg |

Solución de vitaminas para el medio Kirk.

Para 1 litro de agua destilada.

| | |
|---------------------------|----------|
| Biotina | 2.00 mg |
| Acido fólico | 2.00 mg |
| Clorhidrato de tiamina | 5.00 mg |
| Riboflavina | 5.00 mg |
| Clorhidrato de piridoxina | 10.00 mg |
| Cianocobalamina | 0.10 mg |
| Niacina | 5.00 mg |
| Pantotenato de calcio | 5.00 mg |
| Acido p-aminobenzoico | 5.00 mg |
| Acido DL-6,8-tióctico | 5.00 mg |