



Universidad Autónoma Metropolitana-*Iztapalapa*  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Alteración en el metabolismo de *Aspergillus niger* expuesto  
a una corriente eléctrica, durante la degradación de  
hexadecano**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**Presenta:**

**M. B. Nancy Velasco Alvarez**

**Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas**

**Asesor: Dr. Ignacio González Martínez**

**Asesor: Dr. Pablo G. Damián Matsumura**

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados del **CONACyT**, y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el número de registro 0471-O.”

**México, D.F. 10 de Marzo 2011**

El jurado asignado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
Tesis:

Alteración en el metabolismo de *Aspergillus niger* expuesto a una  
corriente eléctrica, durante la degradación de hexadecano.

**Que presentó**

**M. B. Nancy Velasco Alvarez**

Comité Tutorial:

Directo: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dr. Ignacio González Martínez

Asesor: Dr. Pablo G. Damián Matsumura

**Jurado:**

**Presidente: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda**

**Secretario: Dr. Ignacio González Martínez**

**Vocal: Dra. Mercedes T. Oropeza Guzmán**

**Vocal: Dr. Pablo G. Damián Matsumura**

**A mi Madre, Diana**

**A mis grandes amores Ajax y Ayla**

# **Agradecimientos**

Los agradecimientos son, tradicionalmente, el espacio donde vaciamos de manera automática los reconocimientos a las personas que participaron en la elaboración de la Tesis. Solemos dar poca importancia a esta manifestación escrita, pero creo que es un espacio tan importante como lo son los resultados de una investigación de varios años, los agradecimientos es el reconocer que tales resultados son producto de la influencia y ejemplo práctico y teórico transmitido.

El espacio es limitado, las palabras insuficientes para expresarle el agradecimiento a mi madre, que fue el pilar de mis esfuerzos y que ahora, el Doctorado es la expresión misma de su tiempo y vida ofrecida a mi y a mis hermanos. El esfuerzo tuyo mamá, no fue trabajo puntual o esporádico, se mantuvo durante todos los años de mi vida, eres entonces el ejemplo vivo y por ello mereces mi principal dedicatoria, ya que sin el ejemplo de constancia y trabajo continuo no hubiera sido posible concluir el último título académico posible. A mi Padre, por su perseverancia, mis hermanos, la templanza de Ulises, la bondad infinita de Joaquín, el frágil corazón de Diana, también, ya que soy un poco de ustedes.

Este espacio es libre de las manifestaciones y correcciones de mis asesores. Con ello sugiero que ellos son y fueron durante el transcurso del doctorado y la escritura de tesis esa regla académica para la toma de decisiones, para el trabajo, la redacción e incluso el estilo a través del cual se debe transmitir un conocimiento, un resultado numérico, una metodología, que en teoría no debe tener estilo. Siendo tan enorme su influencia en esta etapa, mi vida de profesionista, ya sea como investigadora o en alguna otra área será copia fiel de lo que ustedes me transmitieron en estos cuatro años. Deseo entonces la entrega y pasión con la que los tres se desempeñan.

A mi hija, por que me ha enseñado a través de su existencia que el valor mas importante es la tolerancia y por haber despertado en mi los mas bellos sentimientos. A mi gran amor, Ajax, gracias por todas las enseñanzas y experiencias que hasta el día de hoy siguen vigentes.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio W-103, 108 y los de abajo, a mis grandes amigos de generación, Ángeles, Itza y Ulises.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada

# **Contenido**



<b>Índice de figuras .....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>9</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Revisión bibliográfica.....</b>	<b>15</b>
2.1. <i>Hidrocarburos: hexadecano.....</i>	16
2.1.1. <i>Biodegradación del HXD .....</i>	17
2.1.2. <i>Microorganismos degradadores .....</i>	22
2.1.3. <i>Hongos filamentosos .....</i>	22
2.2. <i>Soportes modelo .....</i>	24
2.2.1. <i>Aplicaciones de los soportes .....</i>	26
2.2.2 <i>Características de la agrolita.....</i>	26
2.3. <i>Tratamiento electrocinético.....</i>	28
2.3.1. <i>Tratamientos electrocinéticos en suelos contaminados .....</i>	28
2.3.2. <i>Tratamientos electroquímicos con microorganismos .....</i>	30
2.3.3. <i>Efecto del tratamiento electroquímico a nivel de membrana.....</i>	31
<b>3. Justificación.....</b>	<b>34</b>
<b>4. Hipótesis .....</b>	<b>37</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
<b>6. Estrategia experimental .....</b>	<b>41</b>
<b>7. Materiales y Métodos .....</b>	<b>44</b>
7.1 <i>Preparación y contaminación del soporte.....</i>	45
7.2 <i>Propagación y conservación de la cepa.....</i>	45
7.2.1 <i>Cosecha de esporas .....</i>	45
7.2.2 <i>Medios de cultivo .....</i>	46
7.3 <i>Unidad Experimental.....</i>	46
7.3.1 <i>Condiciones de cultivo con y sin corriente eléctrica.....</i>	47
7.3.2 <i>Condiciones de cultivo ajustando pH.....</i>	48
7.4 <i>Efecto de la corriente eléctrica y el pH.....</i>	48
7.4.1 <i>Análisis físicoquímicos .....</i>	48
7.4.1.1 <i>Determinación de HXD .....</i>	48
7.4.1.2 <i>Carbono orgánico soluble.....</i>	49

7.4.1.3 Humedad y pH.....	49
7.4.2 <i>Análisis microbiológicos</i> .....	50
7.4.2.1 Obtención y cuantificación de biomasa.....	50
7.4.2.2 Cuenta microbiana total.....	50
7.4.2.3 Respirimetría y tasas de respiración .....	50
7.4.3 <i>Balances de carbono y rendimientos</i> .....	51
7.5 <i>Cambios morfológicos</i> .....	51
7.5.1 <i>Observaciones microscópicas</i> .....	51
7.5.2 <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i> .....	51
7.5.3 <i>Colorante</i> .....	52
7.6 <i>Modificaciones metabólicas</i> .....	52
7.6.1 <i>Obtención de extracto citosólico</i> .....	52
7.6.2. <i>Cuantificación del daño oxidativo</i> .....	52
7.6.3 <i>Cuantificación de ATP total</i> .....	53
<b>8. Resultados y Discusión</b> .....	<b>54</b>
8.1 <i>Efecto de la corriente eléctrica y pH</i> .....	55
8.1.1 <i>Variaciones en la producción de biomasa y degradación de HXD por efecto de la corriente eléctrica</i> .....	55
8.1.1.1 <i>Producción de Biomasa</i> .....	55
8.1.1.2 <i>Degradación de HXD</i> .....	57
8.1.2 <i>Variaciones del pH por efecto de la corriente eléctrica</i> .....	58
8.1.3 <i>Variaciones en la producción de biomasa y degradación de HXD, por efecto del pH</i> .....	60
8.1.3.1 <i>Producción de biomasa y degradación de HXD</i> .....	60
8.2 <i>Efecto de la corriente eléctrica en la respiración y distribución del carbono</i> .....	62
8.2.1 <i>Cinéticas de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub></i> .....	62
8.2.2 <i>Distribución de carbono y rendimientos</i> .....	65
8.3 <i>Evaluación de las alteraciones en la membrana por efecto de la corriente eléctrica</i> .....	68
8.3.1 <i>Análisis del efecto de la corriente eléctrica sobre la morfología de A. niger por microscopía electrónica</i> .....	69
8.3.2 <i>Evaluación de la permeabilidad membranal de A. niger con y sin corriente eléctrica</i> .....	73

8.3.3 Efecto de la corriente eléctrica sobre la lipoperoxidación de las membranas de <i>A. niger</i> .....	75
8.4 Evaluación de las alteraciones metabólicas por efecto de la corriente eléctrica.....	79
8.4.1 Tasas de producción de biomasa y degradación de HXD.....	80
8.4.2 Tasas de respiración.....	82
8.4.3 Coeficiente respiratorio.....	84
8.4.4 Cinéticas del contenido total de ATP .....	85
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>88</b>
<b>10. Perspectivas .....</b>	<b>90</b>
<b>11. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>92</b>
<b>12. Anexos.....</b>	<b>103</b>

# Índice de figuras

<b>Figura 2.1.</b> Formación del palmitoil-CoA a partir de la degradación aerobia del HXD.....	18
<b>Figura 2.2.</b> Formación del acetil-CoA a partir del Palmitoil CoA en la $\beta$ -oxidación. ....	20
<b>Figura 2.3.</b> Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. ....	21
<b>Figura 6.1.</b> Estrategia general de las cuatro etapas experimentales. <b>Etapas 1:</b> Efecto de la corriente y pH, <b>Etapas 2;</b> Balances de carbono, <b>Etapas 3;</b> Alteraciones en la membrana por efecto de la corriente y <b>Etapas 4;</b> Alteraciones metabólicas por efecto de la corriente.....	43
<b>Figura 7.1.</b> Esquema de la celda electroquímica .....	47
<b>Figura 8.1.</b> Producción de biomasa en las diferentes zonas de la celda electroquímica. Antes y después de aplicar una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm <sup>2</sup> durante 24 horas, después de 114 horas de cultivo. (*) Celda control (sin corriente), (i) zona anódica de la celda, (ii) zona media y (iii) zona catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.....	56
<b>Figura 8.2.</b> Cinética de degradación de hexadecano en presencia y ausencia de una corriente eléctrica en las diferentes zonas de la CE: (*) Celda control (sin corriente), (i) zona anódica de la celda electroquímica, (ii) zona media y (iii) zona catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente. ....	57
<b>Figura 8.3.</b> Cambios de pH a lo largo de la celda electroquímica al aplicar una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm <sup>2</sup> . (*) Celda control (sin corriente), (i) zona anódica, (ii) zona media y, (iii) zona catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.....	59
<b>Figura 8.4.</b> Ajuste de pH. a) Degradación de HXD a diferentes valores de pH y b) producción de biomasa durante diferentes valores de pH. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.....	61
<b>Figura 8.5.</b> Consumo de O <sub>2</sub> acumulado en las tres secciones de la CE, antes y después de aplicar una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm <sup>2</sup> (24 h, después de 114 h de cultivo). (i) CE control (sin corriente), (ii) CE con corriente. Las barras de error representan la desviación estándar en tres réplicas de los análisis. ....	62
<b>Figura 8.6.</b> Producción de CO <sub>2</sub> acumulado en las tres secciones de la CE. Antes y después de aplicar una corriente eléctrica (0.42 mA/cm <sup>2</sup> ; 24 h). (i) Celda control (sin corriente), (ii) Celda electroquímica (con corriente). Las barras de error representan la desviación estándar del promedio en tres réplicas de los análisis. ....	64
<b>Figura 8.7.</b> Distribución de carbono a partir de la degradación de HXD por <i>A. niger</i> , después de 12 días de cultivo (mg de C consumido). (a) En experimentos sin corriente	

eléctrica. (b) En experimentos con corriente eléctrica. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de tres replicas de los análisis. ....	66
* Aplicación de corriente (4.5d), ** Retiro de corriente (5.5 d).....	66
<b>Figura 8.8.</b> Micrografías electrónicas de barrido de <i>A. niger</i> , después de 5.5 días de cultivo. (a) Conidioforo control en ausencia de la corriente eléctrica. (b, c y d) Conidioforo expuestas a una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm <sup>2</sup> , durante 24 horas. Muestras de cada una de las secciones de la CE (sección anódica, media y catódica, respectivamente). Las flechas indican las estructuras de los conidioforos. Barra: 5 y 2 μm. ....	70
<b>Figura 8.9.</b> Micrografías electrónicas de barrido de <i>A. niger</i> , después de 5.5 días de cultivo. (a) Masa micelial proveniente de la CE control. (b, c y d) Hifas expuestas a la corriente eléctrica (0.42 mA/cm <sup>2</sup> ; 24 h). Muestras de cada una de las secciones de la CE (sección anódica, media y catódica, respectivamente). Barra: 5 y 2 μm. ....	71
<b>Figura 8.10.</b> Micrografías electrónicas de barrido de <i>A. niger</i> , después de 5.5 días de cultivo. (a) Esporas control en ausencia de la corriente eléctrica. Barra: 5 μm. (b, c y d) Esporas expuestas a una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm <sup>2</sup> , durante 24 horas. Barra: 2, 5 y 1 μm, respectivamente. ....	72
<b>Figura 8.11.</b> Micelio teñido con colorante de lacto fenol. (a) Sin corriente eléctrica y (b) después de aplicar una corriente eléctrica. Observadas por microscopio convencional (40X).....	73
<b>Figura 8.12.</b> Micelio de <i>A. niger</i> teñido con colorante azul Tripano. (a) Sin corriente eléctrica y (b) después de aplicar una corriente eléctrica. Observadas por microscopio (X40) .....	74
<b>Figura 8.13.</b> Micelio teñido con colorante azul de metileno. (a) Sin corriente eléctrica y (b) después de aplicar una corriente eléctrica. Observadas por microscopio convencional.....	75
<b>Figura 8.14.</b> Efecto de la corriente sobre la concentración de MDA en <i>A. niger</i> con respecto al tiempo de tratamiento. Símbolos; (*) Celda control (sin corriente), (i) sección anódica de la celda, (ii) sección media de la celda y (iii) sección catódica de la celda. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente. ....	76
<b>Figura 8.15.</b> Efecto del pH sobre la concentración de MDA en <i>A. niger</i> con respecto al tiempo de tratamiento. Símbolos; (i) -●-, pH 2.2, simulando sección anódica; (ii) -□--, pH 6.3, simulando sección media; (iii) -▲-, pH 9.1, simulando sección catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente. ....	78
<b>Figura 8.16.</b> Tasas de producción de biomasa y degradación de HXD por <i>A. niger</i> , en función del tiempo (a) tasas de producción de biomasa y (b) tasas de degradación de HXD. Símbolos: (i) -□- con corriente eléctrica y (ii) -■- sin corriente eléctrica.	

<i>Cada punto representa experimentos independientes y las barras de error representan la desviación de triplicados.....</i>	<i>81</i>
<b>Figura 8.17.</b> <i>Tasas de consumo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, después de 12 días de cultivo en experimentos sin corriente eléctrica. Las barras de error representan la desviación estándar en tres réplicas de los análisis.....</i>	<i>82</i>
<b>Figura 8.18.</b> <i>Tasas de consumo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, después de 12 días de cultivo en experimentos con corriente eléctrica. Las barras de error representan la desviación estándar en tres réplicas de los análisis.....</i>	<i>83</i>
<b>Figura 8.19.</b> <i>Coefficiente respiratorio (C.R) de A. niger, con y sin corriente eléctrica, durante la degradación de HXD. ....</i>	<i>84</i>
<b>Figura 8.20.</b> <i>Contenido Total de ATP en A. niger, en función del tiempo, con y sin corriente eléctrica. Símbolos: (*) Celda control (sin corriente), (i) sección anódica de la celda, (ii) sección media de la celda y (iii) sección catódica de la celda. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.....</i>	<i>85</i>

# **Resumen**



Debido a los problemas de contaminación con hidrocarburos, se ha promovido una gran variedad de ofertas de tecnologías biológicas de todo tipo, entre las cuales se encuentra el tratamiento bio-electroquímico, que es una combinación de dos tecnologías: 1

a biorremediación y la electrocinética. La biorremediación se ocupa de la utilización de sistemas biológicos, tales como microorganismos, mientras que la electrocinética se basa en el paso de una corriente eléctrica a través de electrodos enterrados estratégicamente en el suelo. El tratamiento bio-electroquímico ha sido diseñado para determinar el comportamiento de los microorganismos (bacterias y levaduras) que han sido expuestos al campo eléctrico con el objetivo de analizar la pérdida de viabilidad, movilidad, modificaciones a nivel de membrana y los cambios resultantes en el metabolismo microbiano; sin embargo, poco se conoce sobre el efecto de la corriente eléctrica en los hongos filamentosos.

En este estudio se evaluaron las alteraciones en el metabolismo de *Aspergillus niger* frente a una corriente eléctrica controlada y la relación con el catabolismo del hexadecano (HXD), en un sistema modelo.

El estudio se realizó en una celda electroquímica cilíndrica de acrílico, con dos compartimentos a los costados para contener las soluciones electrolíticas (0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y los electrodos. En las celdas se adicionó agrolita tamizada (1.19 - 1.68 mm de diámetro) como soporte inerte, medio mineral y HXD (180 mg  $\text{g}^{-1}$ ); la humedad se mantuvo en ~75 %, ajustando el pH inicial a 5 y 30°C. La corriente se aplicó a través de electrodos de titanio recubiertos con óxido de rutenio, colocados a los costados de la celda, 4.5 días después de iniciar el cultivo, se aplicó una corriente de 0.42 mA  $\text{cm}^{-2}$  durante 24 h, después de retirar la corriente eléctrica, el cultivo continuó por 6.5 días más. Los efectos de la corriente eléctrica se evaluaron a través de la degradación de HXD, la producción de  $\text{CO}_2$ , el consumo de  $\text{O}_2$  y el contenido total de ATP. La cuantificación del malondialdehído (MDA) y las imágenes obtenidas por microscopía se emplearon como un indicador de las modificaciones en la membrana.

Al final de 12 días de cultivo, el crecimiento de *A. niger* disminuyó significativamente respecto al control (sin corriente eléctrica). A pesar del bajo crecimiento en los experimentos con corriente eléctrica, la degradación de HXD fue de  $96 \pm 1.4\%$  en sólo 8 días; mientras que,

en los experimentos control fue de  $81 \pm 1.2\%$  después de 12 días de cultivo, observando un estímulo en la degradación de HXD en presencia de la corriente. Por otro lado, la producción de MDA al final del cultivo fue 8 veces mayor en presencia de la corriente en contraste al control. Estos resultados, junto con los severos cambios morfológicos observados demuestran que la corriente eléctrica provoca alteraciones en las membranas celulares. Por otro lado, al analizar los balances de carbono sin corriente eléctrica, al final del cultivo (12 días) se observó un claro metabolismo anabólico, ya que el  $76 \pm 0.09\%$  del carbono proveniente del HXD fue utilizado para la producción de biomasa y sólo un  $25 \pm 0.04\%$  para la producción de  $\text{CO}_2$ . Esta tendencia fue invertida en presencia de la corriente eléctrica al favorecerse un metabolismo catabólico ( $13 \pm 0.01\%$  producción de biomasa y  $74 \pm 0.14\%$  producción de  $\text{CO}_2$ ). Así mismo, el contenido total de ATP fue estimulado durante la aplicación de la corriente eléctrica, fortaleciendo la idea de que la corriente eléctrica modifica tanto el metabolismo de *A. niger*, como las propiedades de las membranas. Finalmente es necesario señalar, que los resultados descritos en este trabajo contribuyen al conocimiento de los efectos de la corriente, en la fase de crecimiento micelial de *A. niger*, abriendo la posibilidad de manipular el metabolismo mediante el uso de una corriente eléctrica controlada de baja intensidad, por periodos cortos de tiempo. Nuestros resultados pueden ser atractivos para la biorremediación de suelos, al disminuir los tiempos de degradación de moléculas orgánicas. Esta es la perspectiva que deja abierta la investigación desarrollada en este trabajo.

# **Introducción**

Con el objetivo de hacer más eficientes los procesos de biorremediación, se ha informado que la aplicación de una corriente eléctrica controlada y de baja intensidad ( $1.56 \text{ mA/cm}^2$ ) puede acelerar o disminuir el metabolismo de los microorganismos. Los efectos finales van desde el estímulo de la producción de metabolitos secundarios (Shin y col., 2002) hasta la degradación de ciertas moléculas orgánicas (Hyo-Sang and Lee, 2001). Algunas explicaciones incluyen cambios de permeabilidad en las membranas, derivados de modificaciones de tipo oxidativo; o bien, estímulos en la actividad enzimática, dependiendo de la naturaleza y estado fisiológico de los microorganismos. También inciden otros factores experimentales como: intensidad de la corriente, tipo de electrodos y tiempos de exposición que pueden llegar a tener efectos desde letales hasta alteraciones metabólicas menores (Thrash y Coates, 2008). Hasta el momento, la mayoría de los trabajos publicados se han enfocado a bacterias y levaduras y poco se conoce sobre el efecto de la corriente eléctrica en hongos filamentosos, los cuales han demostrado un gran potencial en el área ambiental. Velasco-Alvarez (2006), observaron un estímulo en el metabolismo de un hongo filamentoso (*Aspergillus niger*) durante la degradación de HXD, al aplicar una corriente eléctrica controlada. No obstante, hasta el momento la mayoría de las explicaciones giran en torno a las modificaciones en las membranas (Teissie y col., 2005; Coster y Chilcott 2002) y poco se conoce sobre las alteraciones en el metabolismo de los microorganismos al aplicar una corriente eléctrica, y menos sobre el mismo efecto en hongos filamentosos. Es por ello, que en el presente estudio se evaluaron las alteraciones en el metabolismo de *Aspergillus niger* frente a una corriente eléctrica controlada y la relación con el catabolismo del Hexadecano (HXD), en un sistema modelo. *Aspergillus niger* es considerado como uno de los hongos filamentosos de mayor importancia en aplicaciones biotecnológicas, con una sorprendente diversidad de productos de alto rendimiento como; ácido cítrico y producción de enzimas (Sun y col., 2007).

En el presente trabajo se propone evaluar el efecto de un campo eléctrico en las respuestas fisiológicas y metabólicas de *Aspergillus niger*, durante la degradación de HXD, como una interesante alternativa tecnológica que podría permitir manipular y eventualmente, orientar el metabolismo de un microorganismo de interés biotecnológico.

En el primer capítulo se presente una breve introducción al tema. En el segundo capítulo, se definen conceptos y antecedentes generales acerca de la composición, mecanismos de biodegradación y microorganismo degradadores de hidrocarburos. La utilización de los soportes, y principalmente se hace una revisión sobre la aplicación de diferentes intensidades de corriente en microorganismos y los efectos generados por la corriente sobre los mismos. En los capítulos subsecuentes se señala la justificación, hipótesis, objetivos y la estrategia experimental del trabajo. En la estrategia experimental se destacan cuatro etapas del trabajo: En la primera etapa se observó el efecto de la corriente eléctrica y el pH en tres experimentos independientes evaluando: (a) el efecto de la corriente en la producción de biomasa y degradación de HXD; (b) los cambios de pH generados por la corriente eléctrica y (c) el efecto del pH sobre la producción de biomasa y degradación de HXD. En la segunda etapa, se estudió el efecto de la corriente eléctrica sobre el metabolismo utilizando como variables de respuesta a la respiración, la distribución del carbono y los rendimientos. En la tercera etapa se evaluaron las alteraciones en la membrana por efecto de la corriente, en tres experimentos independientes evaluando: (a) los cambios morfológicos por efecto de la corriente eléctrica, por microscopia electrónica de barrido; (b) las alteraciones en la membrana de manera cualitativa, utilizando colorantes y (c) las alteraciones en la membrana cuantificando la formación del malondialdehído (MDA). Por último, en la cuarta etapa, se evaluaron las alteraciones metabólicas por efecto de la corriente a partir de las tasas de producción de biomasa y degradación de HXD, las tasas de respiración de O<sub>2</sub>, consumo de CO<sub>2</sub>, y por último el contenido total de ATP. Posteriormente, se describen los métodos y materiales utilizados para cubrir cada una de las etapas descritas anteriormente. En el octavo capítulo se presenta el análisis de los resultados y la discusión de los mismos. Finalmente, se presentan las conclusiones generales del trabajo y algunas recomendaciones.

## **2. Revisión bibliográfica**

## 2.1. Hidrocarburos: hexadecano

La proporción y composición del petróleo crudo varía de acuerdo a su origen, almacenamiento, refinación y su alteración por las condiciones ambientales. Es una mezcla compleja de cientos de hidrocarburos y otros compuestos, cuya composición consiste solamente de hidrógeno y carbono. Los compuestos que se obtienen al fraccionar el petróleo crudo ó hidrocarburos totales del petróleo (HTP), pueden clasificarse en cuatro principales grupos de acuerdo a su solubilidad en disolventes orgánicos: alifáticos, aromáticos, polares ó resinas y asfaltenos (Sugiura y col., 1997):

- *Saturados o alifáticos*: alcanos lineales y ramificados y cicloparafinas.
- *Aromáticos*: compuestos aromáticos mono, di y polinucleares que contienen cadenas alquílicas y/o cicloparafinas fusionadas.
- *Resinas o polares*: piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.
- *Asfaltenos*: agregados de poliaromáticos, ácidos nafténicos, fenoles polihídricos, ácidos grasos y metaloporfirinas

De manera general, todos estos compuestos aproximadamente el 58.2% de la composición media del petróleo crudo corresponde a hidrocarburos alifáticos, 28.6% a los aromáticos y 14.2% a los hidrocarburos polares (Tissot y Welte, 1984).

Para los fines particulares del presente trabajo nos enfocaremos en los hidrocarburos alifáticos, específicamente al hexadecano (HXD).

Los hidrocarburos alifáticos, de acuerdo con la longitud de la cadena hidrocarbonada pueden clasificarse (Setti y col., 1993) en cuatro grupos: (a) *n*-alcanos gaseosos, C<sub>1</sub>-C<sub>11</sub>; (b) *n*-alcanos líquidos, C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub>; (c) *n*-alcanos semisólidos, C<sub>17</sub>-C<sub>28</sub> y (iv) *n*-alcanos sólidos, >C<sub>28</sub>

Dentro del grupo de alifáticos, destaca el hexadecano (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>), un hidrocarburo incoloro prácticamente insoluble en agua (0.9 µg/L en agua destilada a 25 °C; peso molecular 226 g/mol), como un componente común en el petróleo y es el mayor componente del diesel.

Diversos trabajos (Barreto y col., 2010, Velasco-Alvarez y col., 2010, Volke y col., 2003, 2006), han utilizado al hexadecano (HXD) como molécula modelo para el estudio de la biodegradación de hidrocarburos alifáticos por las siguientes razones: (a) se puede seguir cuantitativamente por cromatografía de gases con facilidad, (b) se ha utilizado como un indicador del potencial de la degradación microbiológica de hidrocarburos, por su fácil asimilación, (c) la bioquímica de su biodegradación ha sido bien caracterizada (Atlas, 1981), y (d) es un componente común en muchos sitios contaminados por hidrocarburos en el suelo.

### *2.1.1. Biodegradación del HXD*

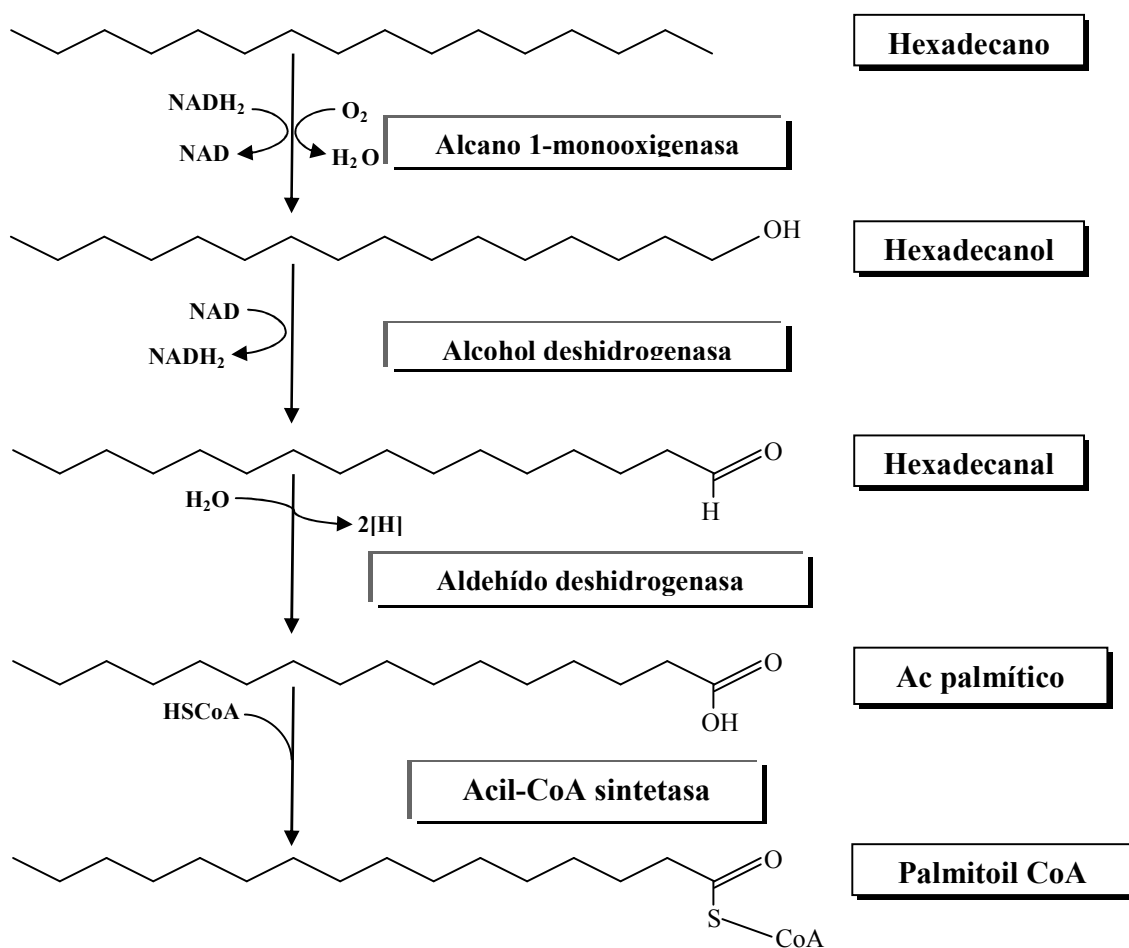
Una característica común de los hidrocarburos es que son biodegradables. La biodegradación se puede definir como aquellos cambios generados por seres vivos, como los microorganismos, en los niveles de óxido-reducción de los átomos de carbono de las moléculas que se biodegradan y/o cambios en la estructura química, en donde el bióxido de carbono es la forma más oxidada del carbono. En la biodegradación en condiciones aeróbicas, la producción final de CO<sub>2</sub> también se conoce como mineralización. Las tasas de biodegradación aerobia dependen de la complejidad de la molécula y de su solubilidad en agua. Sin embargo, se conocen numerosos microorganismos distribuidos en la naturaleza que poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, por lo que el uso de estos microorganismos constituye una alternativa tecnológica viable para la eliminación de los mismos en ecosistemas afectados.

En ecosistemas afectados, la biodegradación de hidrocarburos depende mucho de factores ambientales y físicos. Los primeros se refieren a las condiciones que permiten el desarrollo y actividad de los microorganismos nativos del suelo. En cuanto a los factores físicos, el más importante es la biodisponibilidad de los compuestos para los microorganismos. La biodegradación de hidrocarburos no sólo está controlada por los factores externos, sino que también depende de la estructura química de los compuestos. La susceptibilidad de los hidrocarburos a la biodegradación microbiana radica en el gasto energético requerido para iniciar la oxidación. En una primera etapa, los microorganismos incorporan oxígeno molecular a estos compuestos, por acción de las enzimas monooxigenasas y/o dioxigenasas, y entre más



larga es la cadena alifática o mayor el número de anillos aromáticos asociados, mayor será el gasto energético.

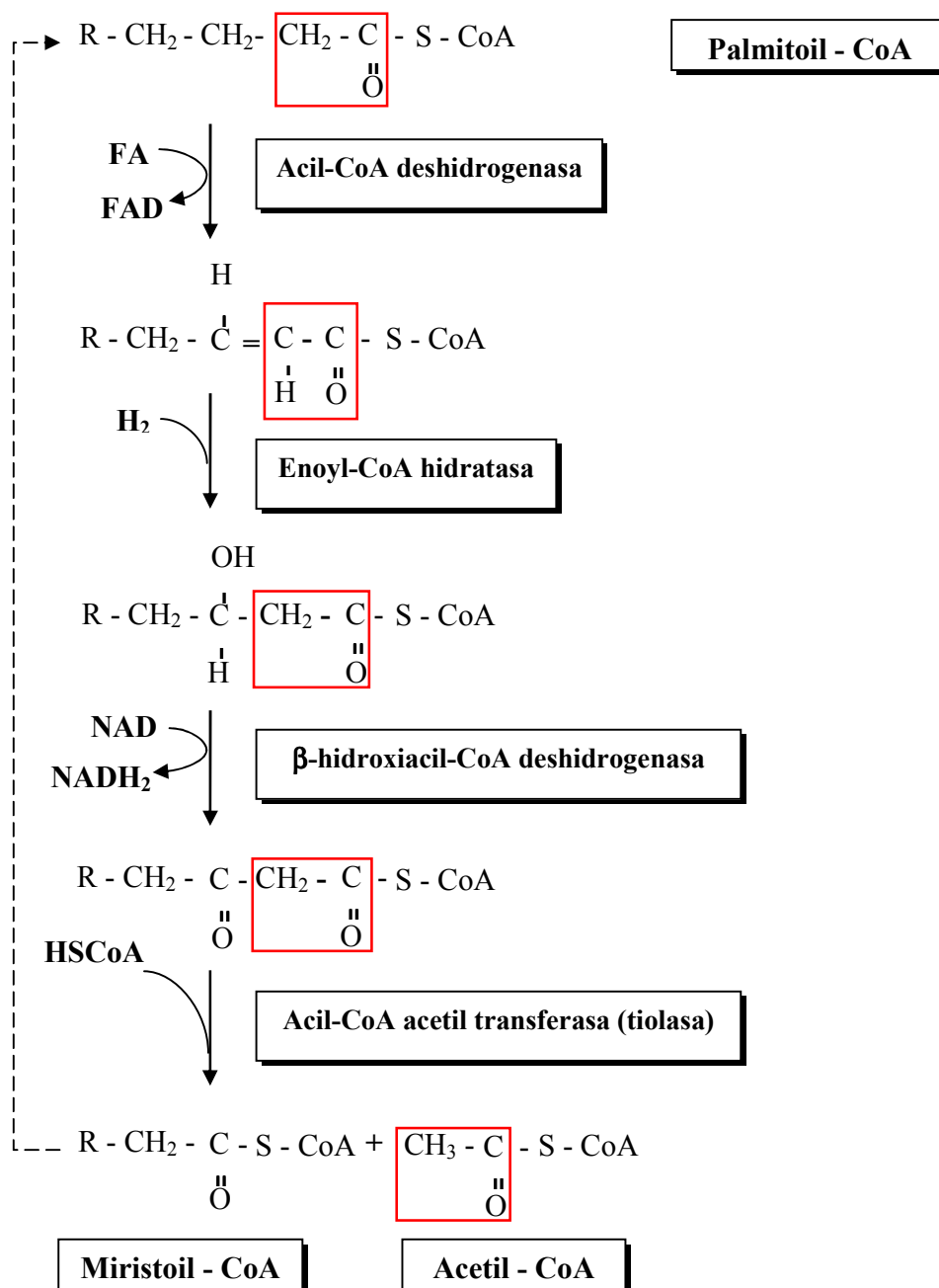
Algunos microorganismos llevan a cabo la degradación de compuestos alifáticos por la vía de la  $\beta$ -oxidación (Bouwer y Zehnder, 1993). Es decir, a través de esta vía, los microorganismos utilizan al hidrocarburo como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Dependiendo del tipo de microorganismo, de su estado fisiológico y de las condiciones del medio el metabolismo se lleva a cabo de diferentes maneras.



**Figura 2.1.** Formación del palmitoil-CoA a partir de la degradación aerobia del HXD.

En la Figura 2.1 se presenta la estrategia general de biodegradación microbiana, para hidrocarburos alifáticos, específicamente para el caso del HXD.

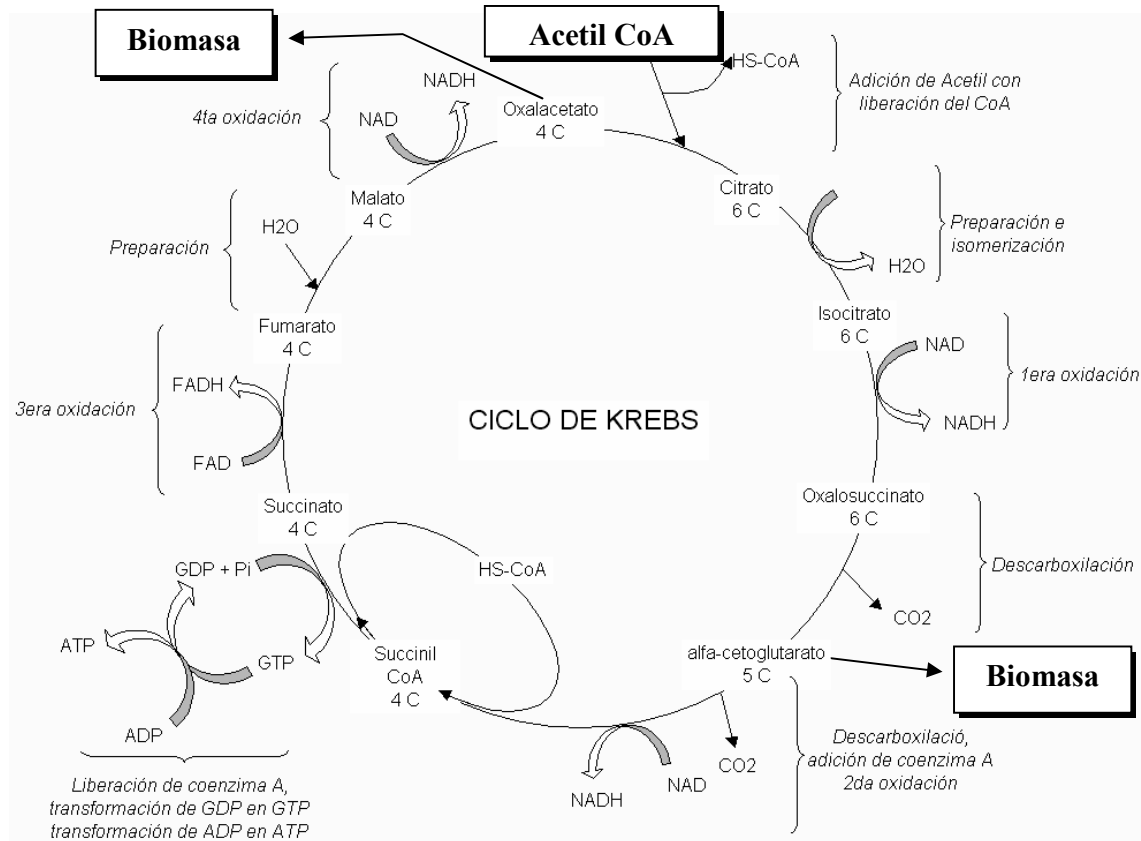
Estas reacciones consisten en la conversión del HXD en ácido palmítico y son catalizadas por un grupo de proteínas denominadas en su conjunto como el "sistema alcano hidroxilasas." El grupo tiene tres componentes principales: una enzima alcano-monooxigenasa, y dos proteínas solubles, la rubredoxina y la rubredoxina reductasa. La rubredoxina transfiere electrones desde el NADH hasta la rubredoxina reductasa. Finalmente, esta proteína transfiere los electrones a una alcano-monooxigenasa, una enzima localizada en la membrana citoplasmática (Van Beilen y col., 1994). El producto final de esta etapa es la palmitoil-CoA. Una vez formada la palmitoil-CoA, debe usarse un transportador para traslocar las moléculas de palmitoil-CoA al interior de la matriz mitocondrial, ya que la membrana mitocondrial interna es impermeable a los complejos acil-CoA; el transportador es la carnitina, que utiliza un mecanismo de dos pasos: (a) la enzima carnitina palmitoiltransferasa I elimina la coenzima A de la molécula de palmitoil-CoA de la membrana mitocondrial externa y, a la vez, la une a la carnitina situada en el espacio intermembranal, originando la palmitoilcarnitina; con esto, la CoA queda libre en el citosol para poder activar otra molécula de ácido graso. Posteriormente, una proteína transportadora llamada translocasa, situada en la membrana mitocondrial interna, transfiere la palmitoilcarnitina a la matriz mitocondrial y, paralelamente; (b) la carnitina palmitoiltransferasa II une una molécula de CoA de la matriz al ácido graso, regenerando así el acil-CoA. La carnitina se devuelve al espacio intermembranal por la proteína transportadora y reacciona con otro acil-CoA, repitiéndose el ciclo.



**Figura 2.2.** Formación del acetil-CoA a partir del Palmitoil CoA en la  $\beta$ -oxidación.

Una vez que la acil-CoA se encuentra en la matriz mitocondrial, entra a la  $\beta$ -oxidación, la cual es una secuencia de cuatro reacciones en las que se separan fragmentos de dos carbonos desde el extremo carboxilo (COOH) de la molécula (Fig. 2.2). Estas reacciones se repiten hasta la

degradación completa de la cadena. La  $\beta$ -oxidación se produce mayoritariamente en la matriz mitocondrial, aunque también se llega a producir dentro de los peroxisomas. Así, por cada molécula de HXD, se realizan 7 ciclos de la  $\beta$ -oxidación, produciendo al final 7 moléculas de  $\text{FADH}_2$ , 7 de  $\text{NADH}$  y 8 moléculas de Acetil-CoA.



**Figura 2.3.** Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs.

Finalmente, el  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$  producidos en la  $\beta$ -oxidación van a oxidarse en la cadena respiratoria y los acetil-CoA ingresan en el ciclo de Krebs (Figura 2.3) donde generan GTP y más moléculas de  $\text{FAD}$  y  $\text{NAD}_2$ . El ciclo de Krebs es un ciclo bioquímico que genera el potencial de reducción ( $\text{NADH}$ ) necesario en la cadena respiratoria para la obtención de energía ( $\text{ATP}$ ) y precursores para la biosíntesis, con la consecuente mineralización de la fuente de carbono hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Wackett y col., 1989).

### 2.1.2. *Microorganismos degradadores*

Se conoce un gran número de microorganismos (bacterias y hongos) capaces de utilizar estos hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, muchos se han aislado de diversos sitios contaminados como: la rizósfera de plantas nativas de zonas contaminadas (Díaz-Ramírez y col., 2003), del fondo y la superficie marina, de sitios con climas de baja temperatura, de sitios con clima desértico y de costas (Prince, 2003).

Una buena parte de los estudios de biodegradación de hidrocarburos se ha centrado en bacterias, sobre todo por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo modificaciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes. Algunos de los géneros de estas bacterias son; *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, (Atlas, 1981), *Bacillus cereus*, *Pseudomonas sp.*, *Gordonia rubripertincta*, *Kocuria rosea*, *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* (Díaz-Ramírez y col., 2003), *Aeromonas*, *Mycobacterium*, *Sarcina*, *Streptomyces*, *Xanthobacter*, *Xanthomonas* (Prince 2003), sólo por mencionar algunos.

Por otro lado, también se conoce un grupo importante de hongos, los hongos filamentosos, que ha demostrado la capacidad de biodegradar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Este grupo ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamientos de descontaminación biológica, que fundamentalmente radica en las características de sus sistemas enzimáticos y en su crecimiento miceliar, que les permite colonizar diferentes tipos de sustratos sólidos y líquidos para acceder a los compuestos tóxicos por biodegradar. Además, la elevada relación superficie/volumen celular de los hongos, los convierte en eficaces degradadores en determinados nichos como, por ejemplo, en suelos contaminados por moléculas orgánicas tóxicas.

### 2.1.3. *Hongos filamentosos*

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas, sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crece en un intervalo de pH de 3 a 8 y a temperaturas entre 15 y 30 °C. Están delimitados por una membrana citoplásmica, que controla la

permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular. La pared celular es un componente importante y constituye del 15 al 30 % del peso seco del hongo, ofrece rigidez y protege a la membrana celular del choque osmótico. El 80 % de la pared celular está constituida de carbohidratos, los más abundantes son quitina, quitosano, glucano y manano (Moore-Landecker, 1996). Aproximadamente el 10 % de la pared celular consiste de proteínas y glicoproteínas (Moore-Landecker, 1996). La estructura fundamental de la membrana celular de los hongos filamentosos consiste en una bicapa lipídica, formada principalmente por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina; además de contener grandes cantidades de proteínas y esteroides como el ergosterol (Moore-Landecker, 1996).

En general, los hongos filamentosos se encuentran en una gran variedad de ambientes naturales como suelos y residuos orgánicos, entre otros; también pueden encontrarse como organismos patógenos en animales y plantas. Debido a su capacidad metabólica, juegan un papel importante en la industria alimentaria; por ejemplo, en la producción de ácido cítrico y la producción de una gama de enzimas industriales (Rordam y col., 2008). En el área ambiental, también se ha demostrado su capacidad para degradar moléculas orgánicas ajenas para el ambiente como por ejemplo, el hexadecano (Volke y col., 2006), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Covino y col., 2010), en la remoción de benzo(a)pireno (Dzul-Puc y col., 2005), pireno (Capotorti, y col., 2004) y fenantreno (Chávez-Gómez y col., 2003), así como en el tratamiento de aguas residuales (More y col., 2010).

Entre los hongos filamentosos destaca el género *Aspergillus*, que son hongos que pertenecen a la clase Deuteromyceta. Estos son organismos que obtienen los nutrientes por absorción y desarrollan un metabolismo quimioheterotrófico, ya que obtienen los nutrientes que requieren a partir de sustancias químicas complejas presentes en la naturaleza; además, sobreviven excretando enzimas que degradan una gran variedad de sustratos orgánicos complejos hasta sustancias simples que finalmente emplean como nutrientes. El metabolismo de *A. niger*, al igual que el de la mayoría de los microorganismos, comprende una serie de enzimas interrelacionadas que controlan las vías catabólicas y anabólicas; es decir, funciones biosintéticas y catabólicas específicas que suministran la energía necesaria que demandan las

células (Rordam y col., 2008), en las que la glucólisis y el ciclo de Krebs constituyen la parte central del metabolismo celular.

En particular, *Aspergillus niger* es uno de los hongos filamentosos que ha demostrado un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas (Sun y col., 2007). Este microorganismo es utilizado en la producción de enzimas extracelulares como glucoamilasas, pectinasas y ácidos orgánicos, como el ácido glucónico (Schuster y col., 2002). Además, hoy en día *A. niger* es considerado como uno de los hongos filamentosos de mayor importancia en aplicaciones biotecnológicas, con una impresionante diversidad de productos de alto rendimiento (Rordam y col., 2008). La publicación reciente de la secuencia del genoma de *A. niger* CBS 513.88 y ATCC 9029, donde se han identificado nueve genes exclusivos en *A. niger* implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios complejos e involucrados en la degradación de compuestos aromáticos, ha hecho evidente el gran potencial para la producción de nuevos productos (Sun y col., 2007). Por lo tanto, diversos investigadores se han dado a la tarea en la reconstrucción del genoma a nivel metabólico, divulgando peculiaridades de gran importancia para las aplicaciones biotecnológicas (Rordam y col., 2008; David y col., 2003). Sin embargo, es necesario comprender la integración de datos a nivel sistémico y vincularlos con el metabolismo. El estudio del metabolismo de los hongos en un cultivo sólido requiere de la utilización de soportes modelo que permitan sólo el crecimiento de los hongos, alterando lo menos posible sus características metabólicas.

## **2.2. Soportes modelo**

La utilización de soportes constituye un punto importante para lograr resultados satisfactorios en los sistemas experimentales modelo. Se utilizan con el objeto de eliminar la complejidad analítica de las matrices de ambientes naturales en donde se alojan los contaminantes, como por ejemplo el suelo. Los soportes modelo son sistemas experimentales ideales para el desarrollo de investigación básica, sobre todo como herramienta para la comprensión de las variables y sus interacciones, que inciden en los procesos de investigación. Por tanto, la selección de un soporte adecuado en el que se puedan desarrollar microorganismos de interés, es crucial. Un soporte adecuado que

permita realizar investigación básica, el cual debe reunir las siguientes características (Ooijkaas y col., 2000, Raimbault 1998):

(a) Inertes; no deben contener inhibidores al crecimiento microbiano que pudiera incorporarse al medio por liberación directa o por reacción con otros componentes. No debe interferir con las técnicas analíticas.

(b) Porosos y con espacios libres disponibles; la porosidad debe permitir el intercambio gaseoso, estos espacios libres deben ser cuantificables. Esta característica debe mantenerse constante durante su uso o modificarse poco,

(c) Resistencia mecánica; la resistencia debe permitir que se mantenga la estructura del soporte durante su uso sin modificaciones y,

(d) Capacidad de retención de agua y nutrientes solubles; debe permitir la formación de producto y crecimiento microbiano, a partir de la disponibilidad de los sustratos y los nutrientes.

En algunos casos se han usado soportes que, además, aportan nutrientes para el desarrollo de los microorganismos, algunos ejemplos son: cáscara de naranja (Aravatinos-Zafirris y col., 1994), paja de avena, desechos hortifrutícolas (Corlay y col., 1999), desechos de piña (Tran y Mitchel, 1994) y bagazo de caña (Bravo y col., 1994) y yuca (Soccol, 1996). En otros casos se han buscado "soportes modelo" en cuanto a forma y tamaño que permitan el uso de medios de cultivo bien definidos, algunos ejemplos son la amberlita (Gutiérrez-Rojas y col., (1995) y la espuma de poliuretano (Zhu y col., 1994), arena y agrolita (Ooijkaas y col., 2000). Estos soportes al ser impregnados con medios definidos, son una herramienta valiosa en investigación, ya que pueden proporcionar grandes beneficios en procesos industriales; exhibiendo ventajas que no son obtenidas con sustratos naturales; como el suelo. Además, de que los soportes modelo facilitan las mediciones de sustancias de interés, se tiene un mejor control fisiológico y cinético en los cultivos sólidos (Zhu y col., 1994). El uso de soportes inertes ofrece una flexibilidad adicional cuando se diseña el medio óptimo para la producción de metabolitos, enzimas, esporas, entre otros (Larroche, 1996). Por ejemplo, muchos hongos filamentosos debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y



bioquímicas, son los que mejor se adaptan a la investigación en cultivos sólidos (Raimbault 1998), puesto que requieren un contacto cercano con los sustratos.

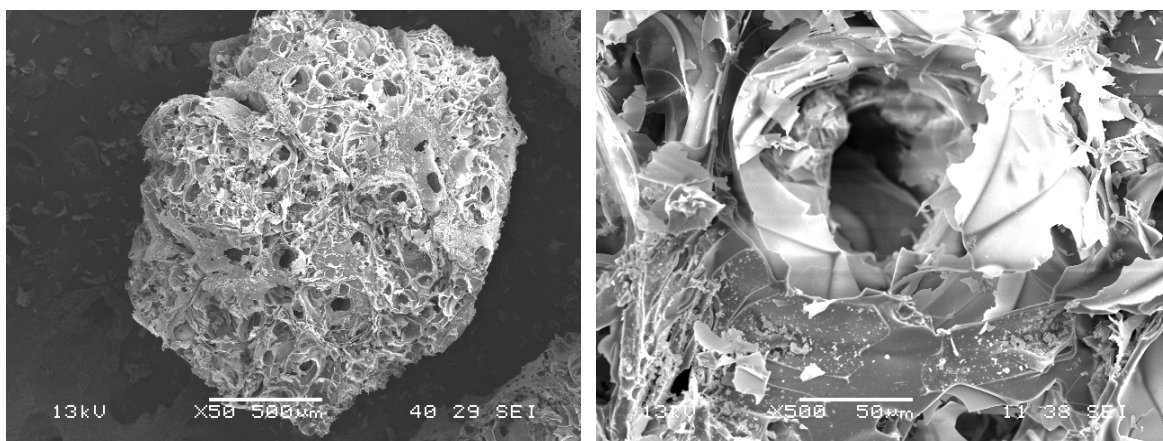
### 2.2.1. Aplicaciones de los soportes

Los soportes utilizados en cultivos sólido han tenido diferentes aplicaciones en el área ambiental, se han utilizado en la biorremediación y biodegradación de compuestos tóxicos, la detoxificación de desechos industriales, la producción de alimento para animales a partir de desechos sólidos, así como en la industria alimentaria y farmacéutica; en la elaboración de antibióticos, aislamiento y purificación de productos, biopesticidas, ácidos orgánicos, producción de alimentos fermentados, pigmentos y saborizantes (Raghavarao y col., 2003; Pandey, 2003). Por ejemplo, Christen y col., (1993) utilizaron amberlita para el estudio del crecimiento y bioconversión de etanol por *Candida utilis*; Gutiérrez-Rojas y col., (1995) en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*; Ozawa y col., (1996) utilizaron espuma de poliuretano para la producción de proteasas; Murado y col., (1997) usaron espuma de poliuretano en la producción de amilasas por *Aspergillus oryzae*. También se han utilizado para estudios de degradación de moléculas hidrofóbicas orgánicas tóxicas como: degradación de alcanos por *Pseudomonas* sobre espuma de poliuretano (Jerábková y col., 1997), biotransformación de hidrocarburos poliaromáticos, sobre arena como soporte (Rama-Mercier, y col., 1998), degradación de fenantreno por *Phanerochaete chrysosporium* y *Aspergillus niger*; degradación de HXD por *Aspergillus niger*, utilizando espuma de poliuretano (Volke y col., 2006) y agrolita como soporte (Velasco-Alvarez y col., 2010); quitosano para inmovilizar bacterias, para la degradación de hidrocarburos (Barreto y col., 2010).

Un soporte modelo interesante que se propone en el presente trabajo es la agrolita, una piedra de origen volcánico cuyas características se detallan en la siguiente sección.

### 2.2.2 Características de la agrolita.

La agrolita es una roca silíceas de origen volcánica del grupo de las riolitas, es una piedra obtenida como consecuencia de un tratamiento térmico entre 1000 y 1200 °C. Se presenta en partículas blancas, cuyas dimensiones varían entre 1.5 y 6 mm, con una densidad baja (aproximadamente 430 kg/m<sup>3</sup>, Roulia y col., 2003).



**Figura 2.4** Imágenes del soporte inerte utilizado en este trabajo (Agrolita), obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

Su capacidad de retención de agua es de hasta cinco veces su peso, con una elevada porosidad. Su pH es cercano a la neutralidad (6.5-7.5), es un material con excelentes propiedades que facilitan el intercambio gaseoso (Rouliá y col., 2003) y, en ocasiones, se utiliza mezclada con otros sustratos como turba para estudios de fitorremediación (Hernández, 2009). En la Fig. 2.4 se muestran imágenes de las partículas de agrolita obtenidas por microscopía electrónica, durante el presente estudio.

La agrolita se ha utilizado satisfactoriamente como un soporte modelo en diversos estudios. En la Tabla 2.1 se presentan algunos trabajos que utiliza agrolita como soporte modelo.

**Tabla 2.1.** Uso de la agrolita como soporte inerte en diversas áreas de estudio.

Uso	Referencia
Fitorremediación de hidrocarburos	Escalante-Espinosa y col., 2005
Fitoextracción de metales	Rojas, 2010
Producción de esporas fúngicas	Silman, 1993
Absorbente para derrames de compuestos de petróleo en agua	Rouliá y col., 2003
Degradación de HXD utilizando una corriente eléctrica	Velasco-Alvarez y col., 2010

La agrolita como soporte inerte es útil cuando se trata de estudiar una nueva línea de investigación, como la del presente trabajo, en donde se procura eliminar la complejidad

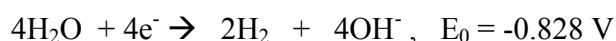
analítica de los ambientes naturales y que, al mismo tiempo, permita realizar investigación básica para la comprensión de las variables que inciden en el proceso, como en el caso del estudio del efecto que provoca la corriente eléctrica sobre el metabolismo de *A. niger*, durante la degradación de hexadecano (HXD).

### 2.3. Tratamiento electrocinético

La electrocinética, como una alternativa para la extracción de contaminantes presentes ya sea en agua o suelo, ofrece una importante posibilidad que ha motivado su aplicación en una gran variedad de contaminantes. La técnica consiste en introducir en el sitio contaminado dos electrodos, entre los que se aplica una adecuada diferencia de potencial o una densidad de corriente. Los principales mecanismos característicos durante el tratamiento electrocinético son (Virkytyte y col., 2002): (a) electromigración: movimiento de especies iónicas disueltas, por efecto del campo eléctrico. Este mecanismo de transporte es el predominante para la remoción de contaminantes inorgánicos como los metales pesados, (b) electroforesis: movimiento de especies disueltas o suspendidas en el medio fluido por efecto de su capacidad de polarización dentro de un campo eléctrico y, (c) electroósmosis: movimiento del agua de solvatación por efecto del cambio de potencial químico inducido por el campo eléctrico.

#### 2.3.1. Tratamientos electrocinéticos en suelos contaminados

En el caso de suelos contaminados, las técnicas electrocinéticas son consideradas como tecnologías emergentes de remediación de suelos *in-situ*, muy efectivas para la remoción de metales pesados y compuestos orgánicos altamente insolubles en agua (Pamukcu y Wittle 1993). El tratamiento electrocinético de un suelo contaminado se conoce como electrorremediación y consiste en la aplicación de una corriente directa de bajo voltaje o de un gradiente de potencial a través de un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) que se insertan en el suelo, las reacciones involucradas durante la aplicación de una corriente eléctrica a través de los electrodos son las siguientes:



Donde  $E_0$  es el potencial estándar, y sirve como valor de referencia para determinar la propiedad oxidante del par redox involucrado (Acar y Alshawabkeh, 1993).

El tratamiento electrocinético desencadena, además del movimiento lento de la fase acuosa a través del suelo, el transporte de las especies contaminantes por arrastre y/o por migración. Así, el flujo de contaminantes a través del suelo es una contribución del flujo electroosmótico y el flujo migratorio que siempre están relacionados con fenómenos de difusión absorción, adsorción y desorción (Shapiro y Probst, 1993). Las reacciones en el ánodo y el cátodo producen, respectivamente, un frente ácido ( $H_3O^+$ ) y un frente alcalino ( $OH^-$ ), que junto con los iones cargados presentes en el electrolito, y bajo la aplicación de un campo eléctrico, provocan la migración de estos iones hacia el ánodo y el cátodo, con ello se propicia la preconcentración o precipitación de los contaminantes (Acar y Alshawabkeh, 1993). Respecto al movimiento del  $H_3O^+$  hacia el cátodo, éste ayuda en la desorción de especies de las superficies de la arcilla y en la disolución de las sales contenidas en el mismo suelo. La migración-difusión de los  $OH^-$  en dirección opuesta puede ocasionar la precipitación prematura de cationes y moléculas orgánicas insolubles (Acar y Alshawabkeh, 1993). Cuando ambos frentes (pH ácido y pH alcalino) se encuentran, se neutralizan uno a otro, esto provoca un cambio drástico de pH en cierta región de la celda. La ubicación del salto de pH está determinada por la movilidad relativa de los iones hidronios e hidroxilo (Pamukcu y Wittle, 1993). La alcalinización del suelo promueve el aumento de flujo electroosmótico, y por ende, la desorción de los contaminantes orgánicos del mismo; mientras que, si se mantiene un frente ácido a través de la celda, el flujo electro-osmótico disminuirá considerablemente y en consecuencia la desorción de los contaminantes orgánicos cesará también (Kim y col., 1999). Es así como las reacciones que ocurren en los electrodos son las que regulan el proceso de electroremediación, y como consecuencia, los cambios de pH tan drásticos podrían llegar a afectar a las poblaciones microbianas presentes en el sistema. Esta serie de fenómenos inducidos por la diferencia impuesta de potenciales electroquímicos son conocidos desde hace mucho tiempo y de hecho la Ingeniería Civil lo ha utilizado desde hace medio siglo para la remoción de humedad tanto de suelos como de paredes y techos de edificios (movimiento del agua de solvatación de los iones, por efecto del campo eléctrico a través del flujo electroosmótico). En la actualidad, la electroquímica se usa también en presencia de

microorganismos; por ejemplo, para determinar alteraciones en las membranas (Vajrala y col., 2008) o en la estimulación y/o inactivación en el metabolismo (Velasco-Alvarez y col., 2010; Guillou y Murr 2002).

### 2.3.2. *Tratamientos electroquímicos con microorganismos*

La aplicación de una corriente de baja intensidad (menor a 20 mA/cm<sup>2</sup>) en microorganismos ha sido utilizada para diversos fines; por ejemplo, en el control de olores y el estado higiénico de los lodos de aguas residuales (Zanardini y col., 2002); para disminuir o eliminar microorganismos indeseables, presentes en la preparación de alimentos a favor de los procesos y la conservación, sin perder sus propiedades organolépticas (Bawcom y col., 1995); también se ha utilizado para estimular el crecimiento, la reproducción y el metabolismo de microorganismos (Van Cauwenberghe, 1997). Sobre todo, se ha aplicado con el objetivo de analizar los cambios resultantes en el metabolismo microbiano, incluyendo modificaciones en la permeabilidad celular (Teissié y col., 2002; Virkutyte y col., 2002). Dependiendo del microorganismo, la intensidad de corriente y del tiempo de exposición, los microorganismos pueden llegar a manifestar efectos desde letales hasta alteraciones metabólicas menores (Thrash y Coates, 2008). Jackman y col., (1999) observan que al aplicar una intensidad de corriente de 20 mA/cm<sup>2</sup> durante 80 horas, disminuye el crecimiento de bacterias acidofílicas nativas del suelo, ellos mencionan que el bajo crecimiento de estas bacterias es debido a cambio de orientación en la polaridad de la membrana, asociados a modificaciones de la carga superficial de las membranas, teniendo como resultado una baja viabilidad, en contraste al control (sin corriente). Resultados similares se reportan por Ranalli y col., (2002) donde observan que las bacterias Gram-positivas y levaduras son menos sensibles a los tratamientos electrocinéticos que las bacterias Gram-negativas, mencionando que estos resultados son debidos a las reacciones químicas inducidas por los tratamientos electrocinéticos, a nivel de la membrana celular. En *Escherichia coli*, se demostró que a bajas intensidades de corriente, con electrodos de grafito (0.6 y 1.3 mA/cm<sup>2</sup>; 72 h) no se observaron diferencias significativas en las actividades (fosfatasa alcalina, esterasa C4, esterasa lipasa C8, leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, fosfoamidasa, b-galactosidasa y a-glucosidasa) ni en el crecimiento; pero al aplicar una intensidad de 2.6 y 5.3 mA/cm<sup>2</sup>; 72 h, se observó una inhibición tanto en el crecimiento como

en la actividad enzimática. Sin embargo, en *Bacillus cereus* no se observó inhibición alguna, por el contrario al aplicar una intensidad de 5.3 mA/cm<sup>2</sup>; 72 h, el crecimiento se vió estimulado (Valle y col., 2007). Xin-gang y col., (2006), reportaron que al aplicar una corriente de 1.98 mA/cm<sup>2</sup>; 21 h, en dos *distintos* consorcios microbianos de suelo, incluyendo hongos, observaron un aumento en la degradación de fenol, como única fuente de carbono (1.2 g/L). En hongos y bacterias, se ha observado un aumento en la tasa de producción de CO<sub>2</sub> hasta en un 290% al aplicar una corriente eléctrica de 0.314 mA/cm<sup>2</sup>, durante 27 días, utilizando 6 diferentes fuentes de carbono (Lear y col., 2004). Lustrato y col., (2006) demostraron que la corriente eléctrica (1,0 A/cm<sup>2</sup>; 16 d) induce cambios en la concentración de ATP, en *S. cerevisiae* debido a los cambios del potencial electroquímico de la membrana celular, afectando el transporte y la transferencia de energía. La mayoría de los trabajos publicados se ha realizado en bacterias, y poco se conoce sobre los efectos de la corriente en hongos filamentosos. Hasta el momento, la mayoría de las explicaciones gira en torno a las alteraciones a nivel de membrana, posiblemente debido al aumento en la concentración de iones hidronio en el interior del citoplasma durante la aplicación de la corriente, provocando la desorganización de la integridad en la célula; además poco se conoce sobre las alteraciones específicas en el metabolismo de los microorganismos, al aplicar una corriente eléctrica, y aún no hay reportes a cerca de las alteraciones del metabolismo en hongos filamentosos.

### 2.3.3. Efecto del tratamiento electroquímico a nivel de membrana

El efecto de la corriente, sobre los mecanismo biológicos de la célula es aun desconocido (Xin-gang y col., 2006). Hasta el momento la mayoría de los estudios se ha enfocado al comportamiento de las membranas plasmáticas (Teissie y col., 2005; Golzio y col., 2004; Coster y Chilcott 2002) y en algunos casos particulares, el trabajo se ha orientado a la membrana mitocondrial (Vajrala y col., 2008). La importancia del estudio en las membranas radica en que éstas, realizan un gran número de actividades importantes, ya que actúan como soporte de un gran número de estructuras moleculares; como los canales iónicos, los transportadores, las bombas iónicas, las proteínas de reconocimiento, las proteínas que sirven de soporte a elementos del citoesqueleto, entre otros (Astumian, 1993; Liu, 1990).

La membrana plasmática se caracteriza por estar eléctricamente polarizada, en estado de reposo el lado interno presenta cargas negativas, mientras que el lado externo cargas positivas (Panagopoulos y col., 2000). Por su composición lipídica, la membrana impide el paso a moléculas hidrofílicas y/o aquéllas con cargas eléctricas (iones). Sin embargo, se comporta como una membrana semipermeable selectiva, frente a este tipo de sustancias hidrofílicas (Lodish y col., 2003); esto se hace a través de proteínas-canales, que son reguladas por señales químicas o por cambios en la diferencia de voltaje que caracteriza a la membrana. Esta diferencia de voltaje o potencial eléctrico en la membrana se mantiene en equilibrio por el trabajo de las bombas iónicas (bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Lodish y col., 2003).

En condiciones fisiológicas normales, el potencial eléctrico en la membrana varía entre 20 y 200 mV dependiendo del tipo de células (Panagopoulos y col., 2000). Cuando se aplica un potencial eléctrico por arriba de este valor, la membrana presenta cambios que producen diversas respuestas bioquímicas y fisiológicas que conllevan al incremento de la conductancia y permeabilidad. Este efecto, conocido como permeabilización, provoca la inducción de poros no selectivos en la membrana celular, de forma transitoria y reversible, sin afectar la viabilidad celular (Teissie y col., 2002). Partiendo de este conocimiento, la mayoría de las investigaciones durante los últimos 30 años, se ha enfocado principalmente en el comportamiento en los lípidos de las membranas, haciendo uso de modelos, para la simulación de membranas celulares, con el objetivo de introducir moléculas extrañas a la célula (Vajrала y col., 2008; Teissie y col., 2005; Coster y Chilcott 2002). Hoy en día la corriente eléctrica se propone como un medio muy eficaz en la industria farmacéutica; por ejemplo, para la introducción de drogas (Gehl, 2003), oligonucleótidos, anticuerpos y plásmidos en células vivas (Gothelf y col., 2003) para aplicaciones biotecnológicas y ambientales (Orlowski y Mir, 1993). Y aunque este tipo de estrategias son rutinarias, en el campo de la biología molecular, poco se sabe de lo que realmente está ocurriendo en la célula y las membranas a nivel molecular (Belehradek y col., 1993; Wolf y col., 1994). La mayoría de los estudios que demuestran las alteraciones en las membranas por el cambio del potencial eléctrico, son descriptivos, y no profundizan sobre su efecto a nivel de la fisiología celular y/o molecular. Teissie y col., (2005) mencionan que la aplicación de un campo eléctrico induce un aumento en el diferencial de potencial de membrana, provocando efectos locales, debido probablemente

a torceduras en las cadenas de lípidos. Cuando se aplican voltajes por arriba del crítico (> 200 mV) se provoca un cambio en la permeabilidad de las membranas, además de afectar la estructura de las células, sin perder su viabilidad. Sin embargo, una vez que la corriente eléctrica es retirada o que el voltaje aplicado está por debajo del valor crítico, se recupera la organización de la membrana. La permeabilidad de la célula vuelve a su estado normal poco a poco, mientras que los cambios estructurales se mantienen por un periodo más largo de tiempo, hasta que las células vuelven finalmente a su estado normal.

A pesar de las múltiples investigaciones, las descripciones moleculares de la transición de la membrana, siguen siendo altamente especulativas. Por lo tanto, el uso seguro de una corriente eléctrica controlada para aplicaciones biotecnológicas, como la manipulación del metabolismo en microorganismos, requiere claramente, un mejor conocimiento de las transiciones asociadas a la membrana y particularmente en hongos filamentosos debido a los pocos trabajos publicados relacionados al estudio de este tipo de hongos con los campos eléctricos. Lo cual es de alta prioridad, si se tiene en cuenta el amplio interés biotecnológico, específicamente por *A. niger*.



## **3. Justificación**

El interés por los efectos de una corriente eléctrica de baja intensidad aplicada sobre los microorganismos, radica en la gran variedad de respuestas que presentan los microorganismos. Las respuestas de los microorganismos van desde la estimulación en el metabolismo, hasta la inactivación total y, aunque existe un gran número de estudios, hasta el momento la mayoría ha sido enfocada al comportamiento de las membranas plasmáticas, dejando a un lado el efecto que produce la corriente sobre el metabolismo. Diversos investigadores han demostrado que la aplicación de una corriente de baja intensidad, puede estimular el metabolismo, acelerando la degradación de moléculas orgánicas. Sin embargo, los estudios han sido orientados principalmente a bacterias, poco en levaduras y hasta el momento, se conoce poco sobre los efectos que produce la corriente en los hongos filamentosos. Estos hongos juegan un papel importante en el área ambiental, particularmente para la degradación de moléculas orgánicas. Por tal motivo, en el 2006, la autora de esta tesis se dió a la tarea de estudiar el efecto de una corriente eléctrica sobre un hongo filamentoso de gran importancia en aplicaciones biotecnológicas como el *Aspergillus niger*, con una impresionante diversidad de productos de alto rendimiento. El estudio consistió en dos etapas, una electroquímica y otra bioelectroquímica:

En la etapa electroquímica se diseñó y caracterizó la CE, con el fin de determinar los valores que adquiere el potencial de celda (V), al imponer diferentes intensidades de corriente eléctrica (mA). A partir de estos resultados se eligieron dos intensidades de corriente (6 y 19 mA) que permitieron evaluar el efecto de la corriente eléctrica sobre la degradación de HXD por *A. niger*. La caracterización se realizó por triplicado, bajo diferentes condiciones y cada caracterización representó un experimento independiente.

En la etapa bioelectroquímica, se aplicaron las intensidades de corriente (6 y 19 mA), en diferentes estadios de crecimiento de *A. niger* (esporas y micelio), durante diferentes periodos de tiempo (12 días y 24 horas, de manera continua). Considerando como variables de respuesta, la degradación de HXD y la producción de biomasa. Después de varios experimentos se seleccionó una corriente de 6 mA con una aplicación continua de 24 h, en presencia de micelio, en donde se observó la mayor degradación de HXD asociada a una baja producción de biomasa, en contraste con el control (sin corriente).

No obstante, a pesar de que se observó un aumento en la degradación de HXD en presencia de la corriente, es necesario continuar con los estudios referentes al comportamiento del hongo frente a la corriente, con el objetivo de entender las alteraciones metabólicas de *A. niger* frente a una corriente eléctrica. Utilizando un sistema modelo en fase sólida, que elimine la complejidad analítica de los ambientes naturales y que permita realizar investigación básica, contribuyendo al conocimientos sobre los efectos de una corriente eléctrica controlada aplicada en la fase de crecimiento micelial de *A. niger*, con la posibilidad de manipular el metabolismo de este organismo, para aplicaciones biotecnológicas.

## **4. Hipótesis**

La aplicación de una corriente eléctrica controlada en el micelio de *A. niger*, favorece el metabolismo catabólico haciendo más eficiente el proceso de biodegradación del hexadecano.

## **5. Objetivos**

## **Objetivo General**

Determinar el efecto de una corriente eléctrica controlada, sobre el metabolismo de *Aspergillus niger* en la degradación de hexadecano.

## **Objetivos Particulares**

Evaluar las variaciones en la producción de biomasa y degradación de HXD con y sin corriente eléctrica.

Evaluar las variaciones en la producción de biomasa y degradación de HXD por efecto del pH.

Evaluar las variaciones en la producción de CO<sub>2</sub>, consumo de O<sub>2</sub> y distribución del carbono con y sin corriente eléctrica.

Evaluar el efecto de la corriente eléctrica en la membrana celular.

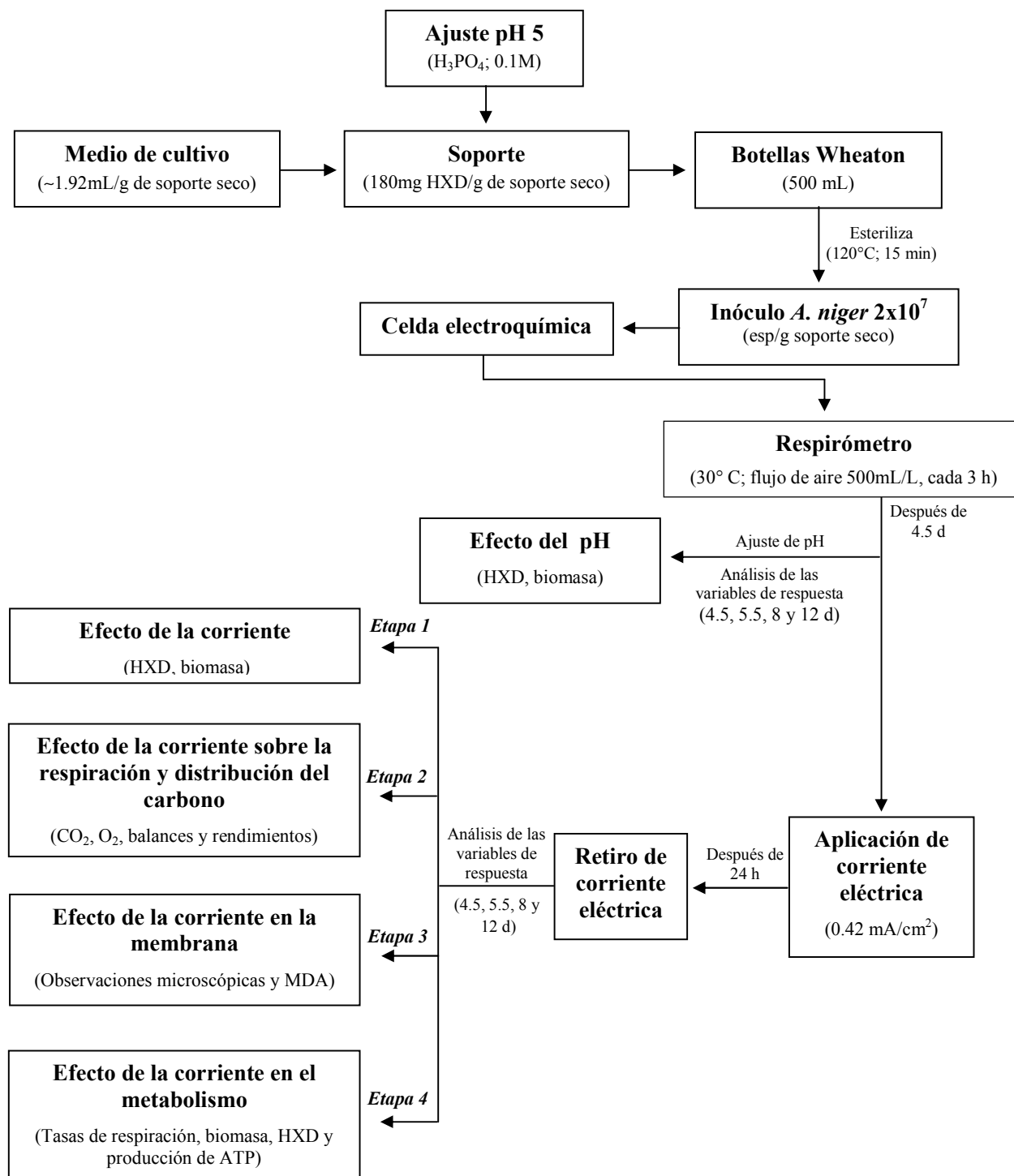
Evaluar las alteraciones en el metabolismo por efecto de una corriente eléctrica controlada de bajo voltaje.

## **6. Estrategia experimental**



El trabajo experimental se dividió en cuatro etapas: En la primera se evaluó el efecto de la corriente eléctrica y el pH en experimentos independientes. En la segunda etapa, se evaluó el efecto de la corriente eléctrica en la respiración y distribución del carbono. En la tercera etapa, se evaluaron las alteraciones en la membrana por efecto de la corriente. Finalmente en la cuarta etapa se evaluaron las alteraciones metabólicas por efecto de la corriente. Cada una de estas etapas se desarrolló utilizando celdas electroquímicas con electrodos de titanio recubierto con óxido de rutenio y empacadas con agrolita previamente impregnada con HXD, medio de cultivo e inoculada con una suspensión de esporas de *Aspergillus niger*. Después de 4.5 días de iniciado el cultivo, se aplicó una corriente eléctrica controlada ( $0.42 \text{ mA/cm}^2$ ; 7V) durante 24 h; la corriente fue retirada y el cultivo continuó por 6.5 días más sin corriente. Las variables de respuesta fueron: consumo de HXD, producción de biomasa, pH, consumo de  $\text{O}_2$ , producción de  $\text{CO}_2$ , formación de UFC, metabolitos solubles en agua (TOC), formación de malondialdehído (MDA) y el contenido total de ATP.

En la Figura 6.1 se muestra de manera esquemática la estrategia general del trabajo.



**Figura 6.1.** Estrategia general de las cuatro etapas experimentales. *Etapa 1*: Efecto de la corriente y pH, *Etapa 2*; Balances de carbono, *Etapa 3*; Alteraciones en la membrana por efecto de la corriente y *Etapa 4*; Alteraciones metabólicas por efecto de la corriente.

## **7. Materiales y Métodos**

## **7.1 Preparación y contaminación del soporte**

Como soporte modelo inerte se utilizó agrolita (Dicalite, México) con un tamaño de partícula entre 1.19 y 1.68 mm. El soporte fue lavado con agua caliente (1L/200g), secado a temperatura ambiente y almacenado en recipientes cerrados de plástico para su posterior utilización.

El soporte limpio y seco fue impregnado con *n*-hexadecano (HXD) (Sigma) como única fuente de carbono.

La contaminación del soporte se realizó impregnando con HXD (180mg de HXD/g de soporte seco) como sigue:

- El HXD se solubilizó en hexano (1.9 mL de hexano por cada 180 mg. de HXD) formando una solución transparente.
- El soporte se impregnó con la solución de HXD-hexano y se homogenizó manualmente.
- El soporte contaminado se extendió en charolas para evaporar el exceso de hexano del soporte en una campana de extracción a temperatura ambiente.

El soporte impregnado con HXD se almacenó en recipientes de vidrio por no más de 3 días.

## **7.2 Propagación y conservación de la cepa**

La cepa utilizada fue un hongo filamentoso: *Aspergillus niger* ATCC 9642. La cepa se resembró por estría en cajas Petri con PDA (agar de papa-dextrosa) se incubó por siete días a 30° C. El procedimiento se repitió en matraces Erlenmeyer (250 ml) hasta completar dos ciclos antes de usarla como inóculo. La cepa se conservó, en tubos de ensaye con PDA y con micelio de 7 días en refrigeración a - 4° C.

### *7.2.1 Cosecha de esporas*

Las esporas de *A. niger* se cosecharon de un cultivo de 7 días (30° C) en PDA. Las esporas fueron suspendidas en una solución de Tween 80 (0.5%), en condiciones asépticas. La suspensión de esporas, se utilizó para inocular las unidades experimentales que se describen adelante. La concentración de esporas para los experimentos con el soporte inerte fue siempre de  $2.0 \times 10^7$  esporas por g de soporte seco, contadas en cámara de Neubauer.

### 7.2.2 Medios de cultivo

Los medios utilizados se detallan en la Tabla 7.1. En ambos casos el pH fue ajustado a 5 (0.1 M).  $\text{H}_3\text{PO}_4$  La solución de oligoelementos está compuesta en g/L por: 0.100  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.015  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.161  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.008  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

**Tabla 7.1** Composición de los medios de cultivo utilizados

Componente	MA (g/L)	MB (g/L)
$\text{NaNO}_3$	5.1	21.23
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.6	3.004
$\text{MgSO}_4$	0.45	0.882
KCl	0.3	3.05
Extracto de levadura	3	-----
Sacarosa	20	-----
HXD (mg/g de soporte)	-----	180
Oligoelementos* (ml/L)	6	6

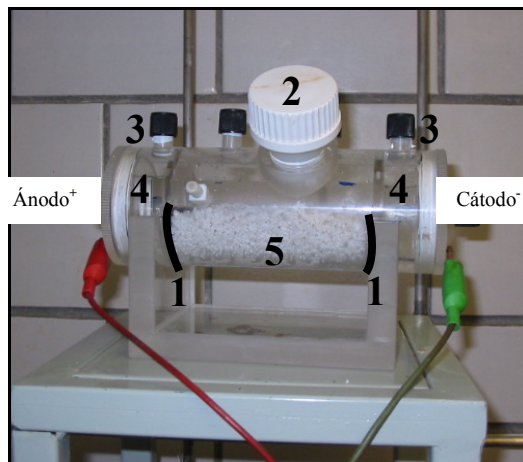
**MA;** medio utilizado para la obtención de biomasa

**MB;** medio para los experimentos de biodegradación del HXD.

Ambos medios (MA y MB) fueron diseñados con base en los requerimientos nutricionales del microorganismo ajustando una relación C/N=25 con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, sacarosa y HXD como únicas fuentes de carbono, respectivamente, conforme experimentos previos realizados en la UAM-I (Volke y col., 2003).

### 7.3 Unidad Experimental

La unidad experimental utilizada en el presente estudio, consistió en una celda electroquímica (CE) cilíndrica (450 mL), construida de acrílico de 18 cm de longitud y 6.5 cm de diámetro. Con dos compartimentos laterales para contener la solución electrolítica (20 mL; 0.1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Se utilizaron dos electrodos de titanio recubiertos con óxido de rutenio (14.13  $\text{cm}^2$ ), colocados a los costados de la celda. En la Figura 7.1 se muestra un esquema del diseño de la celda electroquímica.



- 1) Electrodo de titanio, recubiertos con óxido de rutenio
- 2) Tapa hermética para conexión al respirómetro (medición en línea de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>)
- 3-4) Entrada y depósito para la solución electrolítica
- 5) Depósito para el soporte

**Figura 7.1.** Esquema de la celda electroquímica

### 7.3.1 Condiciones de cultivo con y sin corriente eléctrica

Las CE se empacaron con 15 g de soporte (peso seco), previamente impregnado con HXD, medio mineral y un inóculo de  $2 \times 10^7$  esporas de *A. niger*/g de soporte seco. La humedad y el pH inicial fueron 75 % y 5, respectivamente. Las celdas se conectaron a un respirómetro (Micro-Oxymax; Modelo; System Sample Pump; Columbus, USA), el cual hace pasar un flujo de aire (500 mL/L; 2 min) cada tres horas, la atmósfera desalojada de las CE pasa a través de los sensores que cuantifican O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en línea. Esta operación se lleva a cabo durante los 12 días de cultivo. Después de 114 h (30° C) de iniciado el cultivo, se aplicó una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm<sup>2</sup> mediante un potencióstato-galvanostato (EG & G, PARC 173, USA), durante 24 h sin interrupción; la corriente fue retirada y se continuó con el cultivo por 6.5 días más sin corriente. Para medir las diferentes variables de respuesta, la CE fue dividida en tres secciones longitudinales entre el ánodo y el cátodo (~ 4 cm por sección). Cada sección fue designada como sección catódica (aquella situada hasta a 4 cm del cátodo), sección anódica (a 4 cm del ánodo) y sección media. Las variables de respuesta analizadas (con y sin corriente eléctrica) en cada sección fueron: pH, consumo de HXD, producción de biomasa, formación de UFC, metabolitos solubles en agua, formación de malondialdehído (MDA) y el contenido total de ATP, analizadas a diferentes tiempos (0, 4.5, 5.5, 8 y 12 d) y cada tiempo representa un experimento independiente. Es decir, se analizó el primer tiempo (4.5 d) y el siguiente fue analizado a partir de un cultivo fresco y así sucesivamente hasta analizar todos

los tiempos. La producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de O<sub>2</sub> fueron las únicas variables cuantificadas en toda la celda i.e. en las tres secciones a la vez y durante todo el tiempo de cultivo (12 d).

### *7.3.2 Condiciones de cultivo ajustando pH*

Para distinguir entre el efecto de la corriente eléctrica y el efecto de pH, se realizaron experimentos independientes de la siguiente manera: tres botellas Wheaton (500 mL) fueron conectadas en línea al respirómetro, se empacaron con 15 g de soporte (peso seco), impregnado con HXD, medio mineral e inóculo; se conservaron todas las condiciones de operación de aquellas de los experimentos en la CE con y sin corriente eléctrica, excepto que nunca se hizo pasar corriente. En todos los casos, una vez cumplidas 114 h de iniciado el cultivo (4.5 d), el pH fue ajustado manualmente, de manera gradual, simulando las respuestas de pH generadas en los experimentos con corriente. Para simular la sección media y catódica de la CE con corriente, se utilizaron dos botellas Wheaton a los que se ajustó el pH hasta 6.4 y 9.1 (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), respectivamente. Un tercer reactor se utilizó para simular el comportamiento de la parte anódica a un pH 2.2 (0.1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Las variables de respuesta analizadas para cada botella fueron: producción de biomasa, consumo de HXD, formación de UFC y formación de malondialdehído (MDA). Las variables de respuesta fueron analizadas a diferentes tiempos (0, 4.5, 5.5, 8 y 12 d), cada tiempo fue un experimento independiente. Los análisis se realizaron por triplicado.

## **7.4 Efecto de la corriente eléctrica y el pH**

### *7.4.1 Análisis fisicoquímicos*

#### 7.4.1.1 Determinación de HXD

Para la cuantificación del HXD residual, se utilizó el método EPA 3540C (extracción sólido-líquido de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles en suelos y sedimentos, USEPA, 1996), de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se colocó aproximadamente 1 g de muestra seca más sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual (~1 g), en un cartucho de celulosa (135 x 80 mm), con algodón en la parte superior, para evitar pérdidas.

- Los cartuchos se colocaron en un equipo de extracción Soxhlet (250 mL), con 160 mL de una mezcla acetona-hexano (1:1).
- Cada muestra se mantuvo en extracción continua con reflujo durante 16 horas a 70° C.
- El HXD extraído se concentró en un rota-evaporador al vacío (R-295, Büchi, Zwitterland).
- El HXD extraído se resuspendió en viales de 2 mL con hexano.

El HXD recuperado se cuantificó por cromatografía de gases (Varian: modelo 3900; USA) utilizando una columna Alltech 16367 (15 m x 0.25 mm) y helio como gas acarreador (30 ml/min; 40 psi). Calentando el horno a 120° C (30 °C/min), aumentando la temperatura a 120-150 °C (10 °C/min) hasta 150-170 °C (15 °C/min), el volumen inyectado de las muestras fue de 2 µL.

#### 7.4.1.2 Carbono orgánico soluble

El carbono orgánico total (TOC, por sus siglas en inglés) fue determinado en un equipo TOC-5000A Shimadzu, a partir del mismo extracto utilizado para la determinación de pH. En tubos de ensaye de 10 mL, se colocaron 5 mL de muestra, previamente filtradas con filtros de nylon con tamaño de poro de 0.5 µm (Millez<sup>®</sup> HN Millipore). Para eliminar el CO<sub>2</sub> disuelto en el líquido, todas las muestras se acidificaron con 0.3 mL de una solución de 1 N HCl y se burbujearon con aire por 3 min.

#### 7.4.1.3 Humedad y pH

La humedad se determinó utilizando una termo-balanza Ohaus modelo MB45, por diferencia de peso entre el material húmedo y el material seco. Una cantidad conocida de muestra húmeda (1 a 1.5 g), se colocó en charolas de aluminio, dejándose a 110° C hasta peso constante.

Para determinar el pH en las muestras, a un g de muestra se adicionaron 10 mL de agua destilada, la suspensión se agitó durante 5 minutos. La lectura de pH se realizó en el sobrenadante con un potenciómetro digital (Conductronic pH 20).



## 7.4.2 Análisis microbiológicos

### 7.4.2.1 Obtención y cuantificación de biomasa

La biomasa producida se estimó a través de la cuantificación de proteínas por medio del método de Lowry (1951), utilizando los reactivos comerciales de Bio-Rad Dc protein Assay Kit y biomasa de *A. niger* como estándar. Para la obtención de proteína, se hidrolizaron 0.5 g de muestra seca y pulverizada, con 10 mL de 0.5 N NaOH, posteriormente las muestras fueron sometidas a un baño de agua hirviendo durante 10 min. Después de la hidrólisis se tomaron 200  $\mu$ L de muestra, se agregaron 100  $\mu$ L de reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y 800  $\mu$ L de reactivo B (reactivo Folin diluido), los tubos se agitaron e incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 655 nm en un espectrofotómetro (Varian: modelo Cary 50; Australia).

Las curvas de calibración se realizaron a partir de biomasa de *A niger*, crecida en matraces Erlenmeyer con medio MA (sección 7.2.2) a 30° C; 48 horas.

### 7.4.2.2 Cuenta microbiana total

La cuenta de células viables se realizó por triplicado en cajas Petri con agar de papa y dextrosa (PDA) por diluciones seriadas de una muestra de agrolita (3 g base húmeda). Las cajas Petri fueron incubadas a 30° C durante 72 horas. Se reporta el número de microorganismos, como unidades formadoras de colonias (UFC) por g de muestra de agrolita (base seca).

### 7.4.2.3 Respirometría y tasas de respiración

Para determinar el consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, las CE fueron conectadas a un respirómetro Micro-Oxymax System (Columbus Instruments) a temperatura y aireación constante (500 mL/L; 2 min, cada 3 h). Tanto el consumo de O<sub>2</sub> como la producción de CO<sub>2</sub> fueron determinadas en línea durante 12 días. Las tasas de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, se obtuvieron calculando la pendiente entre los valores de las cinéticas y el tiempo (mg/g de soporte por d).

### *7.4.3 Balances de carbono y rendimientos*

Para realizar los balances de carbono y los rendimientos, se utilizaron los valores promedio de las tres secciones de la CE, de cada una de las variables de respuesta; producción de biomasa, formación de carbono orgánico total, remoción de HXD por efecto de la degradación, producción CO<sub>2</sub> derivado del HXD degradado y el consumo de O<sub>2</sub>; estos dos últimos valores representan el promedio de las tres secciones de la CE. Debido a la naturaleza del diseño de la CE fue imposible identificar la producción de CO<sub>2</sub> así como el consumo de O<sub>2</sub> correspondiente a cada una de las secciones de la CE, después de 12 días de cultivo. Por lo tanto, los balances de carbono y rendimientos se reportan como el total producidos en toda la CE.

## **7.5 Cambios morfológicos**

### *7.5.1 Observaciones microscópicas*

Las modificaciones morfológicas y modificaciones a nivel de membrana por efecto de la corriente eléctrica fueron evaluados de manera cualitativa por microscopía electrónica de barrido y utilizando colorantes (Olympus CX31), respectivamente.

### *7.5.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Las muestras empleadas para las observaciones al microscopio fueron consideradas después de 114 h de cultivo (antes de aplicar la corriente eléctrica) y 24 h después de aplicar la corriente eléctrica. Las células se fijaron al soporte con glutaraldehído al 5% y se dejaron reposar durante 24 h a 4° C, el glutaraldehído fue eliminado mediante varios lavados con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.3 y 0.02 M). Se agregaron 10 gotas de tetra-óxido de osmio, al 2% y se dejaron reposar a 4° C por 1 h. Los residuos de tetra-óxido de osmio fueron eliminados con lavados sucesivos con la solución amortiguadora. Posteriormente, se inició un tren de tratamientos de deshidratación con soluciones de etanol al 30, 40, 50, 70, 80 y 90%, hasta dejar las muestras en etanol absoluto (>99.5%), con dos lavados de cada concentración, por 15 min cada uno. Cada muestra sumergida en etanol absoluto se colocó sobre un filtro Whatman 42 que, a su vez se encontraba dentro de una cápsula microporosa para su deshidratación al punto crítico, a 10 °C y 37 Kg/cm<sup>2</sup> durante 4 min. Las muestras

deshidratadas se colocaron sobre cinta de carbón en un porta muestras para microscopia electrónica y se recubrieron con oro por vaporización en una cámara de recubrimientos, al vacío (44 mTorr), a 18-20 Amp, 5 veces durante 5 minutos. Las muestras recubiertas con oro se observaron en un microscopio electrónico.

### *7.5.3 Colorante*

Los colorantes se utilizaron para evaluar alteraciones en la pared y membranas plasmáticas (Kucsera y col., 2000). Los colorantes que se utilizaron fueron: azul de lactofenol, azul tripán y azul de metileno. Se hizo crecer micelio de *A. niger* en cajas Petri en medio PDA, a 30 °C por 48 h. El micelio fue colocado en un porta objetos, agregando 10 µL del colorante, cubriéndose con un cubre objetos y después de 5 min se observó en un microscopio (Olympus CX31) Para las muestras tratadas con corriente eléctrica, se colocaron 50 µL de colorante más una muestra de agrolita. Se dejó reposar por 15 min, y se observaron al microscopio.

## **7.6 Modificaciones metabólicas**

### *7.6.1 Obtención de extracto citosólico*

El extracto citosólico se obtuvo de la siguiente manera: un gramo de muestra fresca se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido, resuspendido con 5 mL de buffer de fosfato (100 mM, pH 7), las muestras se sonicaron (Sonicor Instrumento; modelo SC-100; Copiague, NY) por 5 min a 4 °C. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación (18,000 g, 4 °C, 25 min). El sobrenadante se utilizó para determinar: el contenido total de ATP y el daño oxidativo de la membrana celular, mediante la determinación de lipoperoxidación.

### *7.6.2. Cuantificación del daño oxidativo*

El daño oxidativo a nivel de membrana se cuantificó a través de la lipoperoxidación por medio de la detección de malondialdehído (MDA), con base en la reactividad del ácido tiobarbitúrico (TBA). La técnica se basa en la reacción de un agente cromogénico, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA a 45° C. Una molécula de MDA reacciona con dos de N-metil-2-fenilindol para formar un cromóforo estable que se cuantificó por espectrofotometría (Buege y Aust, 1978), como sigue: alícuotas (0.5 mL) del sobrenadante (sección 7.6.1) fueron colocadas en tubos de ensaye (15 mL) con 1 mL de una solución de TBA (0.5 %) y TCA (ácido tricloroacético;

15%) en HCl (0.25 N); posteriormente, se colocaron en un baño de agua en ebullición por 15 min. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 5000 g durante 5 min. El curso de la reacción se midió con un espectrofotómetro (Varian; modelo Cary 50; Australia) a 535 nm.

### *7.6.3 Cuantificación de ATP total*

El contenido total de ATP se midió utilizando un kit comercial (ApoGlow® Kit de ensayo; Lonza Rockland, USA). Alícuotas (80 µL) del sobrenadante (sección 7.6.1) fueron colocadas en placas de 96 pocillos, más 100 µL del reactivo NRR. La mezcla se agitó suavemente para la extracción del ATP, dejando incubar por 5 min a temperatura ambiente, se adicionan 20 µL del reactivo RMN (luciferina-luciferasa). La mezcla se colocó en el luminómetro (Multimodo Detector; modelo DTX 880, Beckman Coulter) y se tomó la primera lectura integral inmediatamente (1 s) y 10 minutos más tarde, se tomó la segunda lectura. Finalmente, 20 µL del reactivo ADP-CR se adicionaron en la placa de 96 pocillos y se dejó incubar por 5 min a temperatura ambiente y se tomó la tercera lectura integrada. La luminosidad, expresada en unidades relativas de luminiscencia (RLU), se transformó en concentración de ATP (Sigma) a partir de una curva de calibración construida a partir de concentraciones conocidas de ATP.

## **8. Resultados y Discusión**

## 8.1 Efecto de la corriente eléctrica y pH

Se ha demostrado que la aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad induce alteraciones en el metabolismo de los microorganismos (Shin y col., 2002). Por lo tanto, para demostrar que la corriente eléctrica es la que incide en la eficiencia de degradación del HXD y no el gradiente de pH generado por la misma corriente a lo largo de la CE, se diseñaron tres experimentos independientes: (a) se evaluó el efecto de la corriente en la producción de biomasa y degradación de HXD; (b) se midieron los cambios de pH generados por la corriente eléctrica y (c) se evaluó el efecto del pH sobre la producción de biomasa y degradación de HXD, a continuación se detallan y discuten los resultados obtenidos.

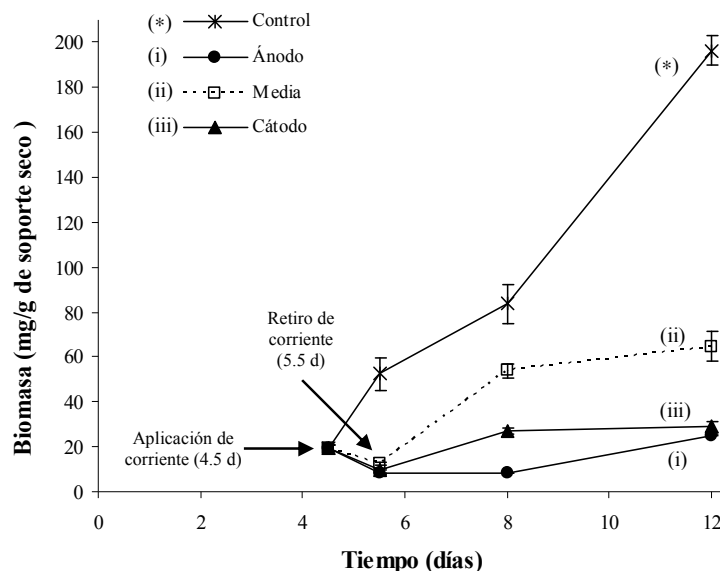
Las muestras fueron analizadas a diferentes tiempos de cultivo (0, 4.5, 5.5, 8 y 12 d) y cada tiempo representa un experimento independiente.

### *8.1.1 Variaciones en la producción de biomasa y degradación de HXD por efecto de la corriente eléctrica*

#### 8.1.1.1 Producción de Biomasa

Para determinar el efecto de la corriente eléctrica sobre el crecimiento de *A. niger* se cuantificó la producción de biomasa. La intensidad y el tiempo de exposición de la corriente eléctrica sobre *A. niger*, se determinó a partir de estudios previos (Velasco-Alvarez, 2006), donde se observó un efecto no letal al aplicar una corriente eléctrica de  $0.42 \text{ mA/cm}^2$ , durante 24 horas, en presencia de micelio, es decir después de la fase lag (114 horas de iniciado el cultivo). En la Figura 8.1 se muestra la cinética de producción de biomasa de las CE con y sin corriente eléctrica, en las diferentes zonas de las CE (anódica, media y catódica); las determinaciones a cada uno de los tiempos representados en la Figura 8.1, representan un experimento independiente. Al aplicar la corriente eléctrica, el crecimiento de *A. niger* disminuyó considerablemente en las tres zonas de la CE, generando concentraciones significativamente menores de biomasa (hasta cuatro veces) respecto a la CE sin corriente (199 mg/g, promedio de las tres secciones de la celda). Al retirar la corriente (24 horas después), a pesar de que la biomasa aumentó en las tres secciones, aun así, la cantidad de biomasa producida fue menor al final del cultivo, que la cuantificada en la CE sin corriente. En las secciones catódica y

anódica, no se presentó una diferencia significativa ( $28.9 \pm 2.4$  y  $25.1 \pm 0.4$  mg/g, respectivamente) en la producción de biomasa, mientras que en la sección media se observó la mayor producción de biomasa ( $64.8 \pm 6.7$  mg/g) después de 12 días de cultivo.



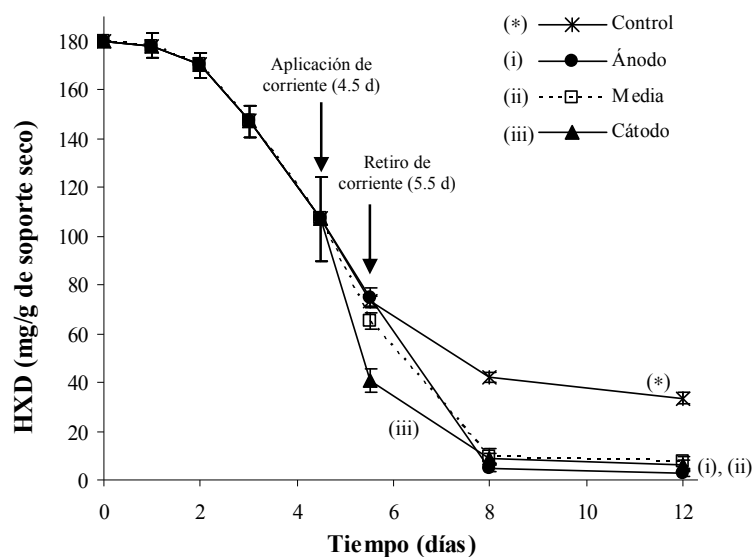
**Figura 8.1.** Producción de biomasa en las diferentes zonas de la celda electroquímica. Antes y después de aplicar una corriente eléctrica de  $0.42 \text{ mA/cm}^2$  durante 24 horas, después de 114 horas de cultivo. (\*) Celda control (sin corriente), (i) zona anódica de la celda, (ii) zona media y (iii) zona catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.

En la literatura se ha reportado que estos resultados pueden deberse a diferentes efectos: a un efecto de lisis en las células, como consecuencia de la resistencia al paso de corriente a través de la celda, provocando un aumento de temperatura en la CE (Palaniappan y col., 1992); otro posible efecto, reportado por Guillo y Murr en 2002 se refiere a la producción de sustancias tóxicas generadas por las reacciones electrolíticas en los electrodos, tales como iones metálicos solubles y la formación de cloro libre, al pasar la corriente eléctrica). Sin embargo, en el caso estudiado en esta tesis quedan descartados ambos efectos ya que en estudios previos (Velasco-Alvarez, 2006), durante la caracterización de la CE al imponer diferentes intensidades de corriente eléctrica, se observó que en un intervalo de 0 a  $3.5 \text{ mA/cm}^2$ , la temperatura nunca fue mayor a  $25^\circ \text{ C}$ . Por otro lado, los electrodos utilizados fueron de titanio recubiertos con óxido de rutenio. Estos electrodos evitan la formación de sustancias tóxicas,

debido a que las reacciones electrolíticas que llevan a cabo son reacciones de oxidación y reducción del agua, generando únicamente un gradiente importante de pH. Por lo tanto, con estos resultados se demostró que es el paso de una corriente eléctrica la que tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de *A. niger*, como lo mencionado por Sale y Hamilton, (1967); inclusive estos autores mencionan que la muerte de las células requiere pulsos de altos voltajes de 25 kV; 40-100 ms, y que la duración de los pulsos no está relacionada con los productos de la electrólisis (formación de sustancias tóxicas), ni con los cambios de temperatura, sino más bien a un efecto directo de la corriente eléctrica en las células. Es importante mencionar que otra posible causa puede ser los cambios de pH, generados en las diferentes zonas de la CE (ver sección 8.1.2).

#### 8.1.1.2 Degradación de HXD

Con el objeto de determinar el efecto de la corriente en la degradación de la única fuente de carbono y energía en *A. niger*, se cuantificó el HXD residual en las CE. En la Figura 8.2 se muestra la cinética de degradación de HXD con y sin corriente eléctrica.



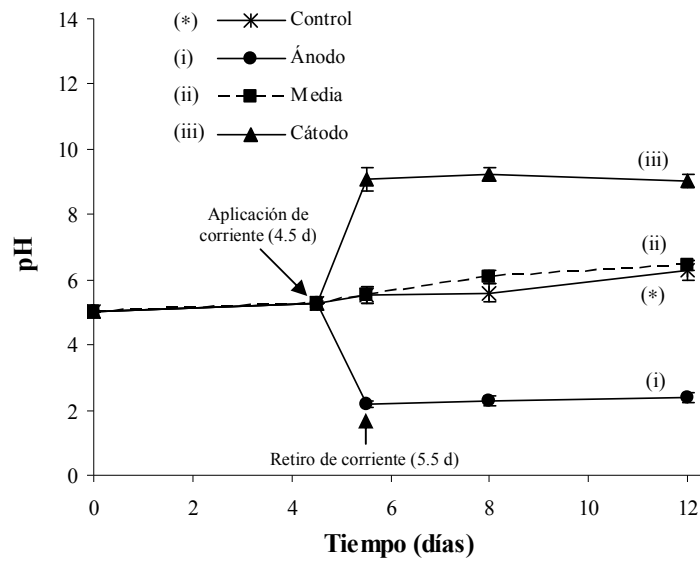
**Figura 8.2.** Cinética de degradación de hexadecano en presencia y ausencia de una corriente eléctrica en las diferentes zonas de la CE: (\*) Celda control (sin corriente), (i) zona anódica de la celda electroquímica, (ii) zona media y (iii) zona catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.



Antes de aplicar la corriente en las CE (~4.5 días), la degradación promedio de HXD fue de 36 %. Este nivel de degradación está asociado con la germinación de esporas y la producción de metabolitos para la formación de micelio, a partir de la degradación de la única fuente de carbono y energía (d'Enfert C., 1997). Durante la aplicación de la corriente (24 h), la sección en la que se presentó una mayor degradación fue la sección catódica (77 %), seguida por la sección media (64 %), mientras que la sección anódica y el control no presentaron diferencias significativas (59 %). Sin embargo, después de retirar la corriente, específicamente en el día 8 de cultivo, se observó que el HXD fue prácticamente degradado en las tres secciones de la CE con corriente ( $96 \pm 1.5$ , promedio de las tres secciones), mientras que en la CE control la degradación al final del cultivo (12 d) fue sólo del 82 %. Estos resultados demostraron que los tratamientos con corriente eléctrica, incrementaron la eficiencia en la degradación de HXD, a pesar de que el crecimiento de *A. niger* prácticamente se interrumpió en presencia de la corriente (Fig. 8.1). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Jackman y col., (2001) quienes demostraron que la aplicación de una corriente (0.89 mA/cm<sup>2</sup>; 21 d) a través de suelo contaminado, favorece la degradación de compuestos orgánicos (811 mg/kg; ácido 2,4-diclorofenoxi acético). Por otro lado, Shin y col., (2002) observaron en *Clostridium thermocellum* ATCC 35609 que la aplicación de una corriente (0.1-20 mA; 15 y 78h) aumenta la producción de etanol (52%), respecto al control sin corriente. Estos resultados podrían estar relacionados a cambios en la permeabilidad de la membrana por efecto de la corriente eléctrica o bien al pH, favoreciéndose el paso del sustrato hacia el interior de la célula, con el consecuente aumento en la degradación del sustrato.

#### 8.1.2 Variaciones del pH por efecto de la corriente eléctrica

Con la finalidad de evaluar los cambios de pH por efecto de la corriente eléctrica, se midió esta variable a lo largo de la CE, antes y después de aplicar la corriente eléctrica. En la Figura 8.3, se muestran los cambios de pH en las diferentes zonas de la CE. En los experimentos sin corriente, los cambios de pH sólo aumentaron poco más de una unidad respecto al pH inicial (de 5 a 6.3), debido a las reacciones metabólicas durante la degradación de HXD.



**Figura 8.3.** Cambios de pH a lo largo de la celda electroquímica al aplicar una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm<sup>2</sup>. (\*) Celda control (sin corriente), (i) zona anódica, (ii) zona media y, (iii) zona catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.

Como se observa, al aplicar la corriente, se generó un pH alcalino hasta de 9.1 en la sección catódica; en la sección anódica un pH ácido de 2.2 y; en la parte media de la celda, el pH fue similar al control sin corriente (6.3). Los valores de pH en la sección catódica y anódica de las CE se mantuvieron constantes después de interrumpir la corriente. Estos cambios de pH fueron generados principalmente por las reacciones de oxidación y reducción del agua con la formación de aniones y cationes (Acar y Alshawabkeh, 1993) al cerrar el circuito eléctrico. Estos cambios de pH, generados por la corriente podrían explicar la disminución observada en el crecimiento; sin embargo, al comparar el pH en la sección media con corriente y en la CE sin corriente se observó prácticamente el mismo pH durante el cultivo; no obstante, la cuantificación de biomasa fue tres veces menor con corriente que sin corriente. Estos resultados sugieren que la corriente eléctrica podría estar alterando el metabolismo de *A. niger* provocando una disminución en el crecimiento y no las variaciones de pH.

### 8.1.3 Variaciones en la producción de biomasa y degradación de HXD, por efecto del pH

#### 8.1.3.1 Producción de biomasa y degradación de HXD

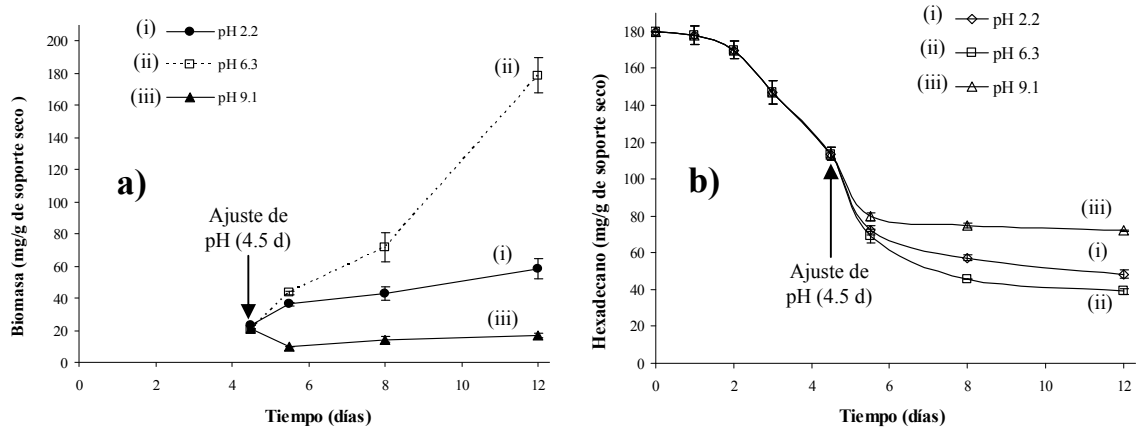
Para discernir entre el efecto de la corriente y el efecto del pH, en la degradación de HXD y producción de biomasa, se realizaron experimentos independientes sin corriente, utilizando tres reactores de 500 mL (botellas Wheaton) como se describe en la sección de Materiales y métodos. Los reactores se ajustaron a los mismos pH generados por la corriente eléctrica. Para estos experimentos se consideró el mismo pH que se determinó en cada una de las secciones de la CE, al final de la aplicación de la corriente eléctrica (al día 5.5).

**Tabla 8.1.** Valores de pH en los experimentos de simulación de corriente eléctrica.

	Tiempo(días)		
	5.5	8	12
pH 2.2	2.0 ± 0.5	2.4 ± 0.2	2.5 ± 0.3
pH 6.4	5.9 ± 0.0	6.1 ± 0.4	5.8 ± 0.5
pH 9.1	9.4 ± 0.3	8.9 ± 0.6	8.7 ± 0.8

Los resultados son la media ± la desviación estándar (n = 3).

Para simular la parte media y catódica de la CE con corriente, en dos reactores Wheaton se ajustó a un pH de 6.4 y 9.1 (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) respectivamente, este ajuste se hizo después de 114 h de iniciado el cultivo. Se utilizó un tercer reactor para simular el comportamiento de la parte anódica a un pH 2.2 (0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Al final del cultivo en los tres reactores Wheaton, no se observaron diferencias significativas entre los valores de pH inicialmente ajustados y los valores finales como se muestra en la Tabla 8.1. Los resultados de degradación de HXD y producción de biomasa de este experimento, se muestran en la Figura 8.2.



**Figura 8.4.** Ajuste de pH. a) Degradación de HXD a diferentes valores de pH y b) producción de biomasa durante diferentes valores de pH. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.

El crecimiento de *A. niger* y la degradación de HXD, en los experimentos de simulación fueron diferentes a los observados en la CE con corriente. En el reactor a pH 9.1, el crecimiento de *A. niger* es bajo (16.9 mg/g, Fig. 8.4 a, iii) asociado a la degradación más baja de HXD (60 %, Figura 8.4 b, iii), al final del cultivo. En el reactor a pH 2.2 la producción de biomasa fue dos veces mayor (Figura 8.4 a, i) con respecto a la sección anódica de la CE con corriente (Figura 8.1, i); sin embargo, la degradación de HXD fue 17 % mayor en presencia de la corriente eléctrica. Finalmente, en el reactor a pH 6.3, (Figura 8.4 a, ii), la producción de biomasa fue 2.8 veces mayor en contraste a la sección media de la CE; mientras que la degradación de HXD (Figura 8.4 b,ii) fue menor en contraste con los resultados de la sección media de la CE con corriente (Figura 8.2 ii). Estos resultados indican que hay una inhibición en el crecimiento de *A. niger* al ser sometido a una corriente, esto coincide con Jackman y col., (1999) quienes encontraron una disminución en el crecimiento de bacterias acidofílicas, al aplicar una corriente eléctrica (20 mA/cm<sup>2</sup>; 80 h), en el mismo sentido Guillou y Murr (2002), en *Saccaromyces cerevisiae* (1 - 108 mA/cm<sup>2</sup>; entre 3 h y 6) y Jong-Chul y col., (2003) quienes también encontraron una inactivación de microorganismos en agua de mar (1.55 mA a 2 A; 1.55 a 34 min). Por lo tanto, los resultados logrados demostraron que *A. niger* fue incapaz de degradar los mismos niveles de HXD que los observados con corriente, sugiriendo que el aumento y rapidez en la degradación de HXD observados en la Figura 8.4b, son propiciados al

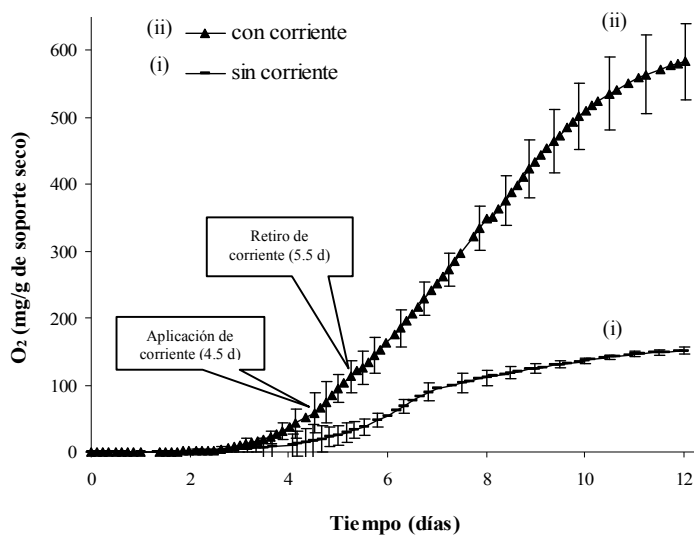
efecto que provoca la corriente sobre *A. niger* independientemente de los cambios de pH generados.

## 8.2 Efecto de la corriente eléctrica en la respiración y distribución del carbono

El consumo de O<sub>2</sub> es asociado a la biotransformación inicial de la fuente de carbono (HXD); mientras que la producción de CO<sub>2</sub> es un índice del grado de mineralización, además de proporcionar información acerca del tipo de metabolismo (Volke y col., 2003). Por lo tanto, para demostrar que la corriente eléctrica modifica el metabolismo de *A. niger* durante la degradación de HXD, se cuantificó el consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub> y con esta información se realizaron los balances de carbono y se evaluaron los rendimientos.

### 8.2.1 Cinéticas de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>

Dado que el consumo de O<sub>2</sub> se puede asociar a la biotransformación inicial de la fuente de carbono (HXD), y la producción de CO<sub>2</sub> está relacionada a la mineralización de la misma fuente de carbono. Estas dos variables se determinaron de forma continua durante todo el cultivo (12 d).



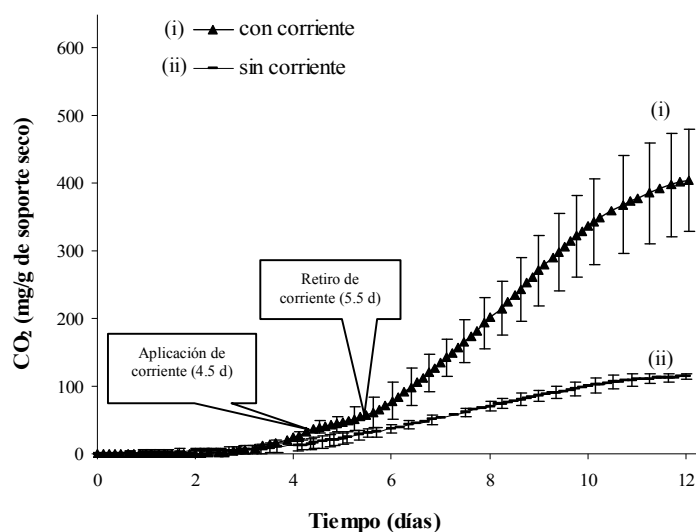
**Figura 8.5.** Consumo de O<sub>2</sub> acumulado en las tres secciones de la CE, antes y después de aplicar una corriente eléctrica de 0.42 mA/cm<sup>2</sup> (24 h, después de 114 h de cultivo). (i) CE control (sin corriente), (ii) CE con corriente. Las barras de error representan la desviación estándar en tres réplicas de los análisis.

En las Figuras 8.5 y 8.6 se presentan las cinéticas de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, en toda la CE, respectivamente.

En ambas Figuras (8.5 y 8.6), se observa que la fase lag tiene una duración de aproximadamente 3.5 días, representando aproximadamente un 29 %, del total del cultivo. El estancamiento de la fase lag, podría deberse a interferencias del hexadecano al paso del agua desde la agrolita hasta las esporas, y por consecuencia, un retraso en el hinchamiento de la espora como primera etapa a la germinación. Estos resultados también han sido observados en otros estudios por ejemplo: Volke y col., (2006), reportan una fase lag de 3 días, utilizando el mismo hongo del presente estudio y hexadecano como fuente de carbono, por otro lado Díaz-Ramírez (2004), menciona que para mezclas de hidrocarburos alifáticos puede llegar a ser hasta de 6 – 9 días la duración de la fase lag, utilizando cultivos mixtos definidos.

Después de la fase lag, el consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> fue en aumento, en presencia y ausencia de la corriente eléctrica. En los tratamientos con corriente eléctrica, el consumo de O<sub>2</sub> acumulado fue evidentemente mayor (hasta 4 veces) comparado con la CE control (sin corriente) al final del cultivo (Fig. 8.5). Antes de aplicar la corriente, no se observó una diferencia significativa entre ambas condiciones; sin embargo, cuando la corriente eléctrica pasa a través de la CE, el consumo de O<sub>2</sub> aumenta (Fig. 8.5ii). Al final de los experimentos se observó un consumo de  $586 \pm 58$  mg de O<sub>2</sub> por g de soporte inerte seco en la CE con corriente y de sólo  $151 \pm 50$  mg de O<sub>2</sub> por g de soporte inerte seco en la CE control (Fig. 8.5i).

Por otro lado, la producción de CO<sub>2</sub> mostró un incremento hasta de tres veces en los tratamientos con corriente (Fig. 8.6ii), en contraste con los tratamientos control (sin corriente, Fig 8.6i).



**Figura 8.6.** Producción de CO<sub>2</sub> acumulado en las tres secciones de la CE. Antes y después de aplicar una corriente eléctrica (0.42 mA/cm<sup>2</sup>; 24 h). (i) Celda control (sin corriente), (ii) Celda electroquímica (con corriente). Las barras de error representan la desviación estándar del promedio en tres réplicas de los análisis.

Durante los primeros 4.5 días de cultivo (antes de la estimulación con corriente) no se observó una diferencia significativa entre los dos tratamientos. Después del día 6 de cultivo, las diferencias en la producción de CO<sub>2</sub> fueron evidentes: 405 ± 75 y 114 ± 04 mg de CO<sub>2</sub> por g de soporte inerte seco, con y sin corriente eléctrica, respectivamente.

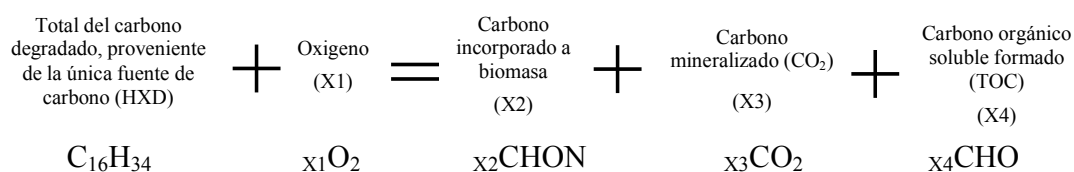
Al relacionar estos resultados con la producción de biomasa (Fig. 8.1) y la degradación de HXD (Fig. 8.2), se observó que la estimulación eléctrica induce una mayor oxidación del sustrato hasta la consecuente mineralización (Fig. 8.6). En presencia de la corriente se generó poca biomasa con una alta producción de CO<sub>2</sub>, en contraste a la CE control, donde se cuantificó una mayor producción de biomasa y baja producción de CO<sub>2</sub>. Indicando, que la corriente eléctrica indujo una inhibición parcial en el crecimiento de *A. niger* sin llegar a provocar un efecto letal en las células; por el contrario, el metabolismo de HXD por *A. niger* se estimula. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lear y col., (2004) que observaron una mayor producción de CO<sub>2</sub> hasta un 290 % al aplicar una corriente eléctrica de 0.314 mA/cm<sup>2</sup> durante 27 días, en un consorcio microbiano con hongos y bacterias; sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo, ellos no observan una diferencia significativa en la

biomasa microbiana, medida como el número de UFC, entre los cultivos con y sin corriente. No obstante, la variedad de respuestas en los microorganismos, depende de la naturaleza y estado fisiológico de los mismos, así como de factores experimentales tales como: intensidad de corriente, tipo de electrodos y tiempo de exposición (Ranalli y col., 2002, Xin-gang y col., 2006, Valle y col., 2007).

### 8.2.2 Distribución de carbono y rendimientos

A partir de la cuantificación de biomasa (0.42 g de carbono/gramo de biomasa) (Velasco-Alvarez 2006), CO<sub>2</sub> y degradación de HXD se realizaron los balances de carbono para toda la celda.

En la Figura 8.7a y b se muestra el balance del carbono recuperado, distribuido entre las diferentes especies (CO<sub>2</sub>, biomasa y TOC), durante los 12 días de cultivo, en presencia y ausencia de la corriente eléctrica. Los balances de carbono se realizaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

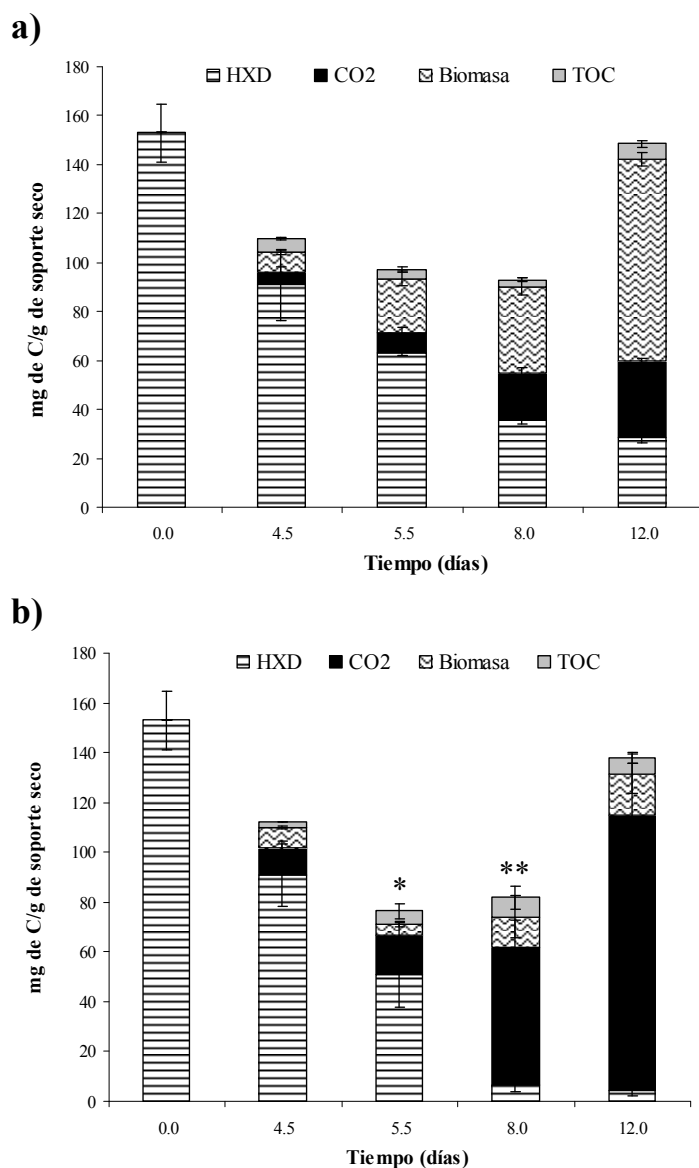


En los balances puntuales, i.e. para cada tiempo de muestreo, se observó una disminución del carbono asociado al HXD y la aparición de carbono, asociado a la formación de biomasa y producción de CO<sub>2</sub>, principalmente.

En la Figura 8.7 se presentan los balances de carbono en ausencia y presencia de la corriente, donde se observa que en los tiempos intermedios (4.4, 5.5 y 8 d) la recuperación del carbono fue menor al 65 % del carbono consumido. Esta diferencia podría tener relación con la germinación de esporas y la producción de metabolitos para la formación de micelio (d'Enfert, C., 1997), que no se consideran en la recuperación del carbono. Al final del cultivo (12 d), la recuperación del carbono fue del 89 ± 14 %. No obstante al final del cultivo, (Fig. 8.7b), se observa una fuerte modificación en la distribución del carbono, en presencia de la corriente



eléctrica, al final del cultivo. En la CE control (Fig. 8.7a), la producción de biomasa fue predominante ( $83 \pm 2.8$  mg C/g de soporte), asociada con un bajo rendimiento en la producción de CO<sub>2</sub> ( $31 \pm 1.1$  mg C /g de soporte) y una formación mínima de compuestos orgánicos solubles ( $6 \pm 1.3$  mg C/g de soporte).



**Figura 8.7.** Distribución de carbono a partir de la degradación de HXD por *A. niger*, después de 12 días de cultivo (mg de C consumido). (a) En experimentos sin corriente eléctrica. (b) En experimentos con corriente eléctrica. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de tres replicas de los análisis.

\* Aplicación de corriente (4.5d), \*\* Retiro de corriente (5.5 d)

Por el contrario en los experimentos tratados con corriente eléctrica (Fig. 8.7b), la producción de biomasa fue baja ( $17 \pm 8.1$  mg C/g de soporte), asociada a un alto rendimiento de  $\text{CO}_2$  ( $110 \pm 20.5$  mg C/g de soporte) y una formación mínima de compuestos orgánicos solubles, únicamente  $6 \pm 2.2$  mg C/g de soporte, de la distribución total de carbono.

Por otro lado, los rendimientos: biomasa-sustrato ( $Y_{X/\text{HXD}}$ ), oxígeno-sustrato ( $Y_{\text{O}_2/\text{HXD}}$ ), dióxido de carbono-sustrato ( $Y_{\text{CO}_2/\text{HXD}}$ ) y biomasa-oxígeno ( $Y_{X/\text{O}_2}$ ), se calcularon utilizando la ecuación con base un mol de átomo de C-consumido de HXD como la única fuente de carbono y energía.

**Tabla 8.2.** Rendimientos finales C-Biomasa-C-HXD ( $Y_{X/\text{HXD}}$ ),  $\text{O}_2$ -C-HXD ( $Y_{\text{O}_2/\text{HXD}}$ ), C- $\text{CO}_2$ -C-HXD ( $Y_{\text{CO}_2/\text{HXD}}$ ) y C-Biomasa- $\text{O}_2$  ( $Y_{X/\text{O}_2}$ ) por *Aspergillus niger*, con y sin corriente eléctrica, después de 12 días de cultivo.

	$Y_{X/\text{HXD}}$ mol C-biomasa (mol C-HXD consumido) <sup>-1</sup>	$Y_{\text{O}_2/\text{HXD}}$ mol $\text{O}_2$ (mol C- HXD consumido) <sup>-1</sup>	$Y_{\text{CO}_2/\text{HXD}}$ mol C- $\text{CO}_2$ (mol C-HXD consumido) <sup>-1</sup>	$Y_{X/\text{O}_2}$ mol C- biomasa (mol $\text{O}_2$ ) <sup>-1</sup>
Con corriente	$0.13 \pm 0.01$	$1.48 \pm 0.14$	$0.74 \pm 0.04$	$0.09 \pm 0.01$
Sin corriente (control)	$0.76 \pm 0.09$	$0.46 \pm 0.07$	$0.25 \pm 0.04$	$1.67 \pm 0.07$

Los resultados son la media  $\pm$  la desviación estándar (n = 3).

Los rendimientos fueron calculados en base un mol de átomo de C por mol de C-HXD consumido

En la Tabla 8.2 se muestran los rendimientos finales, en presencia y ausencia de la corriente eléctrica, después de 12 días de cultivo. En la CE control se observó un alto rendimiento  $Y_{X/\text{HXD}}$  de casi 6 veces más, respecto a la CE con corriente. Mientras que el  $Y_{\text{O}_2/\text{HXD}}$  y el  $Y_{\text{CO}_2/\text{HXD}}$  para la CE con corriente, aumentaron hasta 3 veces, respecto al control (sin corriente). Estos resultados sugieren que el  $\text{O}_2$  consumido en la CE control es utilizado principalmente para la producción de biomasa; como se indica con los valores de  $Y_{X/\text{O}_2}$ , en ausencia de la corriente eléctrica se consume 18 veces más oxígeno para la producción de biomasa, respecto a los experimentos con corriente eléctrica. Mientras que en presencia de la corriente eléctrica, el  $\text{O}_2$  es utilizado principalmente para la oxidación completa del HXD. Con estos resultados se demostró, que en ausencia de la corriente eléctrica se favorece un metabolismo anabólico, mientras que en presencia de la corriente eléctrica, el metabolismo es alterado completamente, favoreciéndose el metabolismo catabólico. Como se demuestra en la siguiente reacción estequiométrica.

	HXD (mg C-HXD)	$Y_{X/HXD}$ (mg C-biomasa/mg C-HXD)	$Y_{CO_2/HXD}$ (mg C-CO <sub>2</sub> /mg C-HXD)	CHO (mg C-TOC/mg C-HXD)
Sin corriente	1	0.66 ± 0.02	0.25 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Con corriente	1	0.11 ± 0.06	0.74 ± 0.01	0.04 ± 0.00

Donde se observa claramente la modificación en el metabolismo de *A. niger* durante la degradación del HXD al ser expuesto a una corriente eléctrica, de baja intensidad.

Se conocen reportes que mencionan que los cambios en el metabolismo en los microorganismos, por efecto de una corriente eléctrica, están asociados a alteraciones a nivel de membrana. Por ejemplo, Ganeva y col., (2002) observaron la estimulación de la actividad invertasa al aplicar 15 pulsos eléctricos (3 a 3.15 kV/cm; 3 ms cada 6 h), obteniendo 49 % más actividad, con respecto al control sin corriente. En contraste, Ranalli y col., (2002) estudiaron la producción de ATP en *S. cerevisiae* al aplicar diferentes intensidades de corriente (10, 50 y 100 mA) durante distintos periodos de tiempo (18, 34 y 48 h), obteniendo niveles más bajos de ATP al aplicar la corriente, debido a alteraciones en la función membranal. Sin embargo, hasta el momento se conoce poco sobre los cambios a nivel de membranas en los hongos filamentosos como *A. niger*, en presencia de una corriente eléctrica de baja intensidad.

Se conocen reportes que mencionan que los cambios en el metabolismo en los microorganismos, por efecto de una corriente eléctrica, están asociados a alteraciones a nivel de membrana. Por ejemplo, Ganeva y col., (2002) observaron la estimulación de la actividad invertasa al aplicar 15 pulsos eléctricos (3 a 3.15 kV/cm; 3 ms cada 6 h), obteniendo 49 % más actividad, con respecto al control sin corriente. En contraste Ranalli y col., (2002) estudiaron la producción de ATP en *S. cerevisiae* al aplicar diferentes intensidades de corriente (10, 50 y 100 mA) durante distintos periodos de tiempo (18, 34 y 48 h), obteniendo niveles más bajos de ATP al aplicar la corriente, debido a alteraciones en la función membranal. Sin embargo, hasta el momento no se encuentran reportes sobre los cambios a nivel de membranas en los hongos filamentosos como *A. niger* en presencia de una corriente eléctrica de baja intensidad.

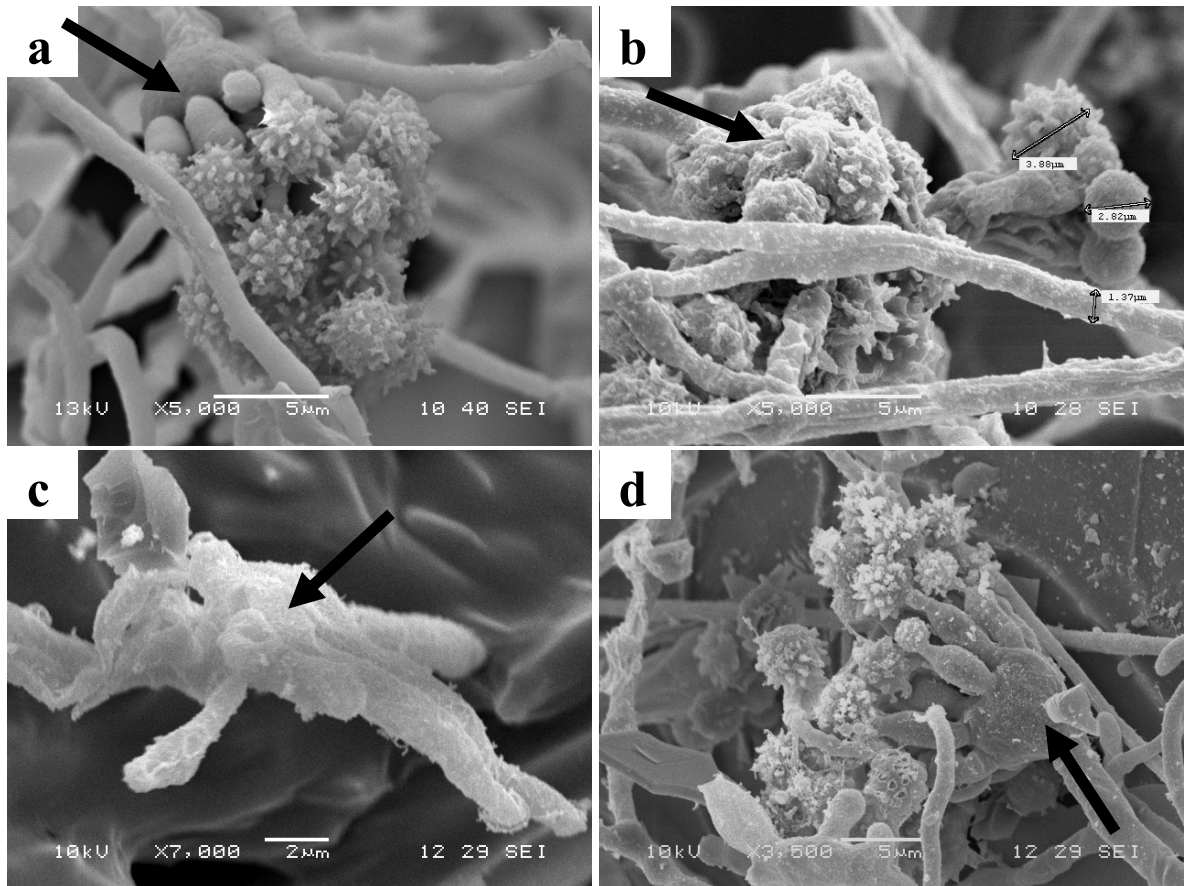
### 8.3 Evaluación de las alteraciones en la membrana por efecto de la corriente eléctrica

Se ha demostrado que la aplicación de corriente eléctrica puede alterar la morfología de los microorganismos, modificar la estructura de la membrana (Ranalli y col., 2002) e incluso

generar la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden atacar biomoléculas como lípidos, proteínas o el ADN (Jeong y col., 2006). Para demostrar la hipótesis de que la corriente eléctrica induce cambios en la permeabilidad de la membrana, se diseñaron experimentos independientes: primero se evaluaron por microscopia electrónica de barrido los cambios morfológicos de la superficie de la membrana de *A. niger* por efecto de la corriente eléctrica y posteriormente las alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, utilizando colorantes.

#### *8.3.1 Análisis del efecto de la corriente eléctrica sobre la morfología de A. niger por microscopía electrónica*

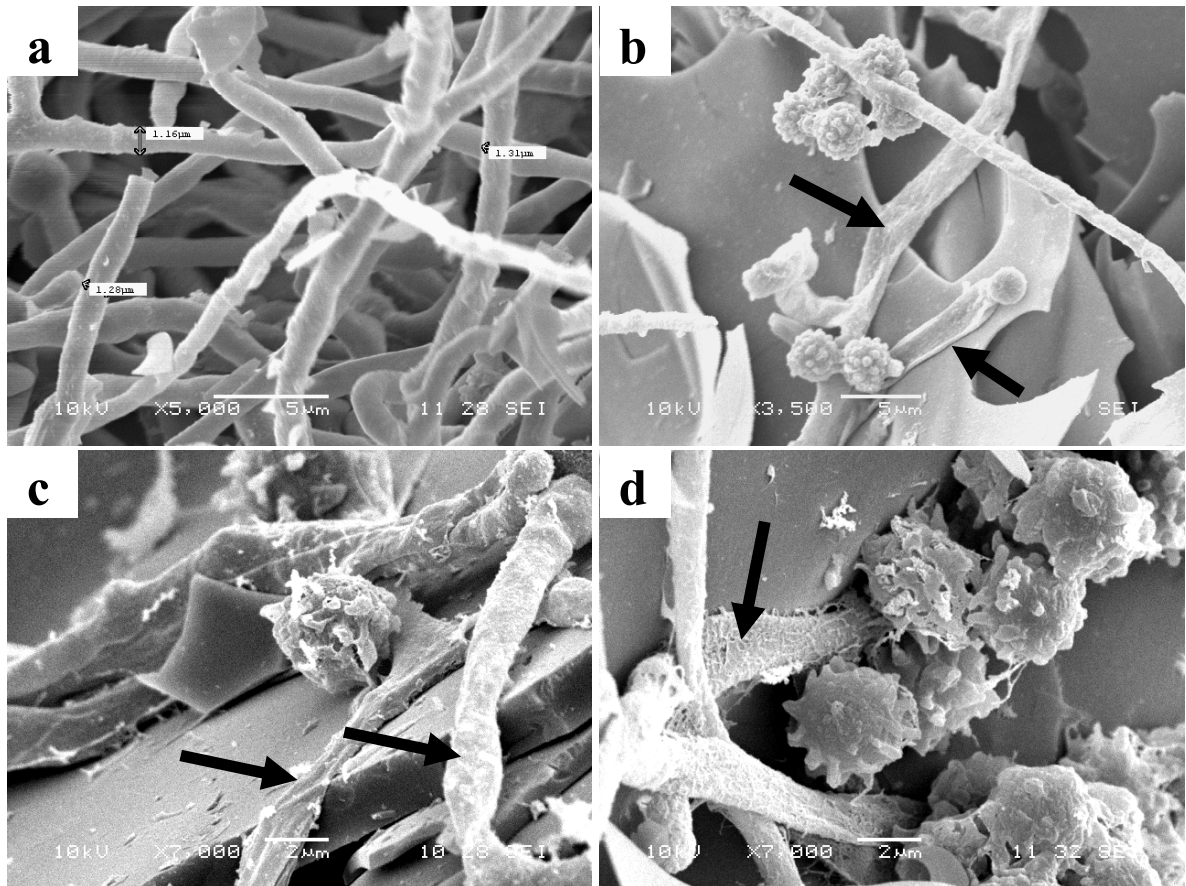
El efecto de la corriente eléctrica ( $0.42 \text{ mA/cm}^2$ ; 24 h) sobre la morfología de *A. niger* se determinó por microscopía electrónica después de 5.5 días de cultivo, una vez que las esporas germinaron. En la Figura 8.8a, se muestra una micrografía electrónica de un conidioforo, proveniente de la CE control. Donde se pueden apreciar estructuras definidas y con una superficie lisa. Mientras que, en las muestras provenientes de la CE con corriente, se observaron cambios morfológicos severos.



**Figura 8.8.** Micrografías electrónicas de barrido de *A. niger*, después de 5.5 días de cultivo. (a) Conidioforo control en ausencia de la corriente eléctrica. (b, c y d) Conidioforo expuestas a una corriente eléctrica de  $0.42 \text{ mA/cm}^2$ , durante 24 horas. Muestras de cada una de las secciones de la CE (sección anódica, media y catódica, respectivamente). Las flechas indican las estructuras de los conidioforos. Barra: 5 y 2  $\mu\text{m}$ .

En las siguientes Figuras (8.8b, c y d), se observan conidioforos con superficies rugosas y poco definidas, e incluso en la Figura 8.8c, de la sección media se puede apreciar el conidioforo aplastado, aparentemente deshidratado por efecto de la corriente eléctrica.

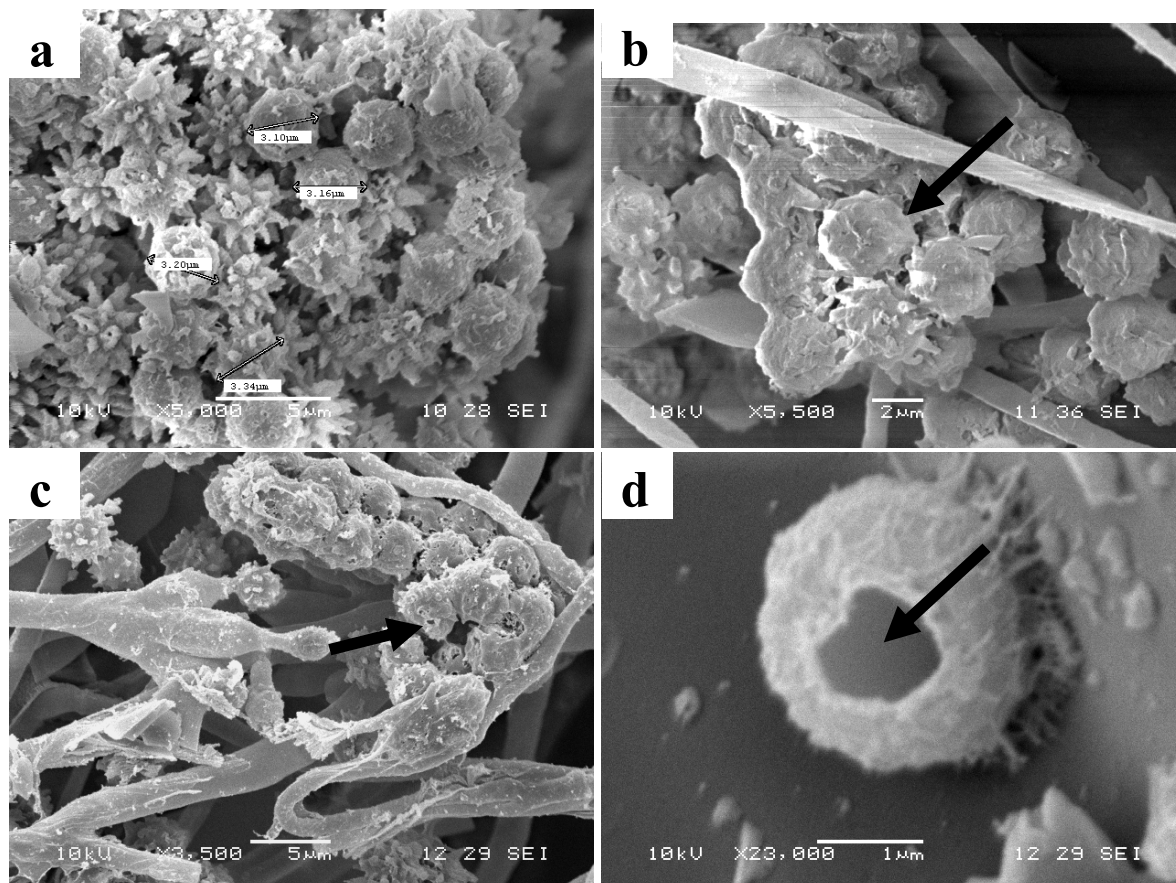
Otra de las estructuras que también fueron analizadas fue el micelio. En la Figura 8.9a, se aprecia un micrografía electrónica proveniente de la CE control. Donde se observa la masa micelial del hongo cubriendo la superficie del soporte, el cual también muestra una superficie lisa y estructuras definidas.



**Figura 8.9.** Micrografías electrónicas de barrido de *A. niger*, después de 5.5 días de cultivo. (a) Masa micelial proveniente de la CE control. (b, c y d) Hifas expuestas a la corriente eléctrica ( $0.42 \text{ mA/cm}^2$ ; 24 h). Muestras de cada una de las secciones de la CE (sección anódica, media y catódica, respectivamente). Barra: 5 y 2  $\mu\text{m}$ .

Sin embargo, después de aplicar la corriente eléctrica, se observaron cambios morfológicos drásticos (8.9b, c y d), observando estructuras con una superficie áspera y aplastada, pareciera como si el contenido celular interno estuviera vacío. Las paredes con apariencia no uniforme, e incluso se observan hifas completamente aplastadas (Figura 8.9c), con una aparente deshidratación en las hifas (Fig. 8.9d). Mientras que en las esporas de las CE con corriente (Figuras 8.10b, c, y d) se muestran con una superficie áspera y aplastada (Figura 8.10b). Las paredes no son uniformes y en algunos puntos se observan desgarradas (Fig. 8.10c), e incluso se observan poros en las paredes (Fig. 8.10d). En contraste, las esporas provenientes de la CE control (Figura 8.10a) se aprecian esporas sanas con estructuras definidas, con un diámetro entre 3.1 y 3.7  $\mu\text{m}$ , y entre 1.1 y 1.6 para el micelio, el cual coincide con lo reportado por

Bauer y col., (2002), donde señalan que el diámetro de las esporas y micelio para *Aspergillus niger* es de 4  $\mu\text{m}$ , cultivadas en agar soya tripticaseina.



**Figura 8.10.** Micrografías electrónicas de barrido de *A. niger*, después de 5.5 días de cultivo. (a) Esporas control en ausencia de la corriente eléctrica. Barra: 5  $\mu\text{m}$ . (b, c y d) Esporas expuestas a una corriente eléctrica de 0.42  $\text{mA}/\text{cm}^2$ , durante 24 horas. Barra: 2, 5 y 1  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Algunos autores mencionan que este tipo de apariencia es típica en las células dañadas por la presencia de los oxidantes fuerte, tales como  $\text{O}_3$  (Jeong y col., 2006). Como lo reportado por Ranalli y col., (2002) ellos señalaron cambios morfológicos similares a los observados en el presente estudio, atribuyéndolos a la pérdida en la organización celular y la viabilidad del microorganismo. Bianchi y col., (1997) mencionan que las alteraciones morfológicas en hongos (específicamente micelio) es causada por modificaciones en la composición de la capa de lípidos en la membrana y que, a su vez, estas alteraciones pueden llevar a modificar la

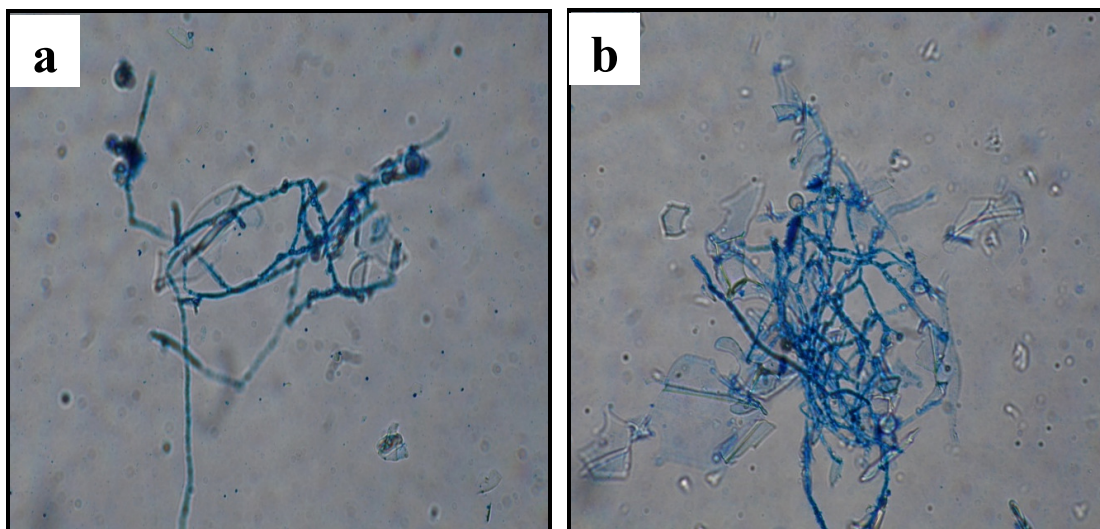
actividad de las enzimas involucrada en la formación de la pared, causando estas deformaciones.

Los resultados descritos anteriormente indican que la corriente eléctrica que pasa a través de sus paredes y membranas modifica drásticamente la morfología del hongo. A pesar de los cambios morfológicos observados y la inhibición en el crecimiento, el metabolismo de *A. niger* no se ve afectado, por el contrario es estimulado, llegando a degradar altas concentraciones de HXD.

### 8.3.2 Evaluación de la permeabilidad membranal de *A. niger* con y sin corriente eléctrica

Los cambios en la permeabilidad de la membrana de *A. niger*, inducida por la corriente eléctrica se realizaron utilizando diferentes colorantes.

El colorante azul de lactofenol el cual tiñe la quitina de las paredes fúngicas, se utilizó para determinar modificaciones en la pared celular del hongo, al ser expuesto a una corriente eléctrica.



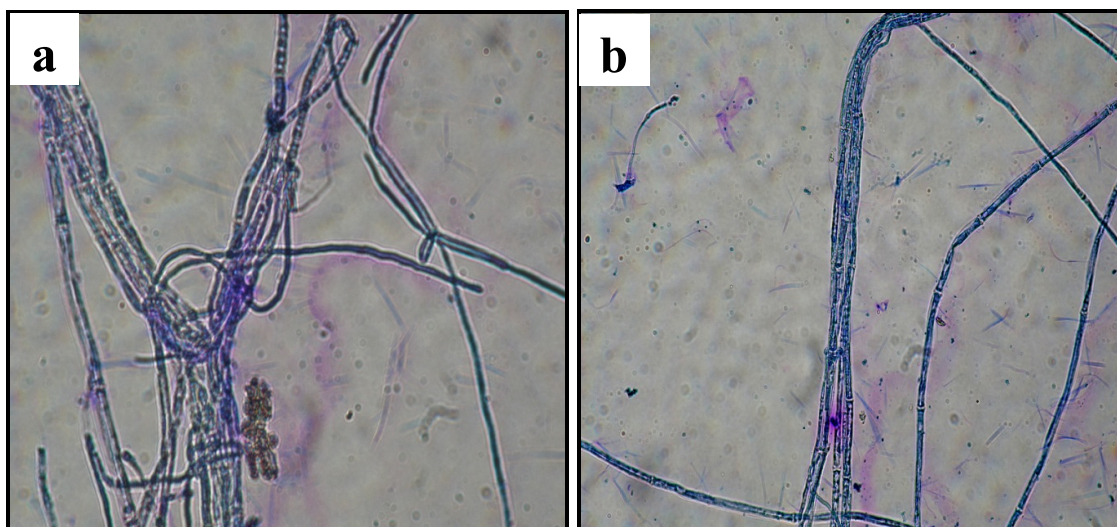
**Figura 8.11.** Micelio teñido con colorante de lacto fenol. (a) Sin corriente eléctrica y (b) después de aplicar una corriente eléctrica. Observadas por microscopio convencional (40X)

En la Figura 8.11a, se presenta la imagen de micelio crecido en agrolita sin corriente, donde se aprecia el micelio teñido completamente, como un indicador de micelio sano. Sin embargo, no



se logró observar una diferencia entre las muestras con y sin corriente eléctrica. Por lo tanto podemos suponer que la corriente eléctrica no daña la pared del hongo cuando es expuesto a una corriente eléctrica.

En la Figura 8.12a se presenta la imagen tomada de muestras provenientes de la CE control, donde se puede apreciar cómo el colorante tiñe la superficie del micelio, con una coloración tenue.



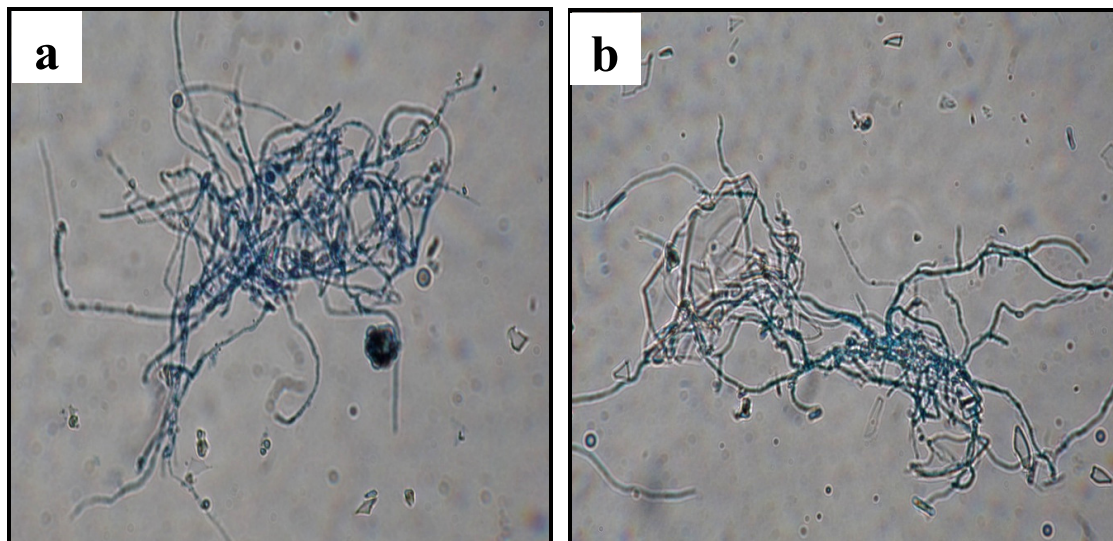
**Figura 8.12.** Micelio de *A. niger* teñido con colorante azul Tripano. (a) Sin corriente eléctrica y (b) después de aplicar una corriente eléctrica. Observadas por microscopio (X40)

Al comparar las imágenes de muestras de la CE control con las imágenes de las muestras tomadas de la CE con corriente (Fig. 8.12b) se logró apreciar una coloración más intensa, incluso en algunas secciones del micelio pareciera que el colorante tiñe las estructuras internas de la membrana.

Estos resultados sugieren que el colorante azul tripano penetra la membrana, lo que nos hace suponer que la corriente eléctrica induce modificaciones en la membrana el cual puede estar asociado a una alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática de *A. niger*.

Por otro lado, el azul de metileno (Fig. 8.13), que se utiliza como indicador redox, permanece azul cuando está oxidado e incoloro cuando está reducido. Al utilizar este colorante se observó como se tiñe la superficie del micelio sano. En micelio expuesto a la corriente eléctrica, se

observó que solo en ciertas zonas del micelio el colorante se decolora, mientras que en otras zonas el colorante permanece azul. Este resultado podría estar indicando un aumento en la actividad metabólica, debido a que el colorante al recibir electrones, en este caso de componentes de la cadena respiratoria, el colorante es reducido y pasa a su forma incolora, como se observa en al Figura 8.13b.



**Figura 8.13.** Micelio teñido con colorante azul de metileno. (a) Sin corriente eléctrica y (b) después de aplicar una corriente eléctrica. Observadas por microscopio convencional

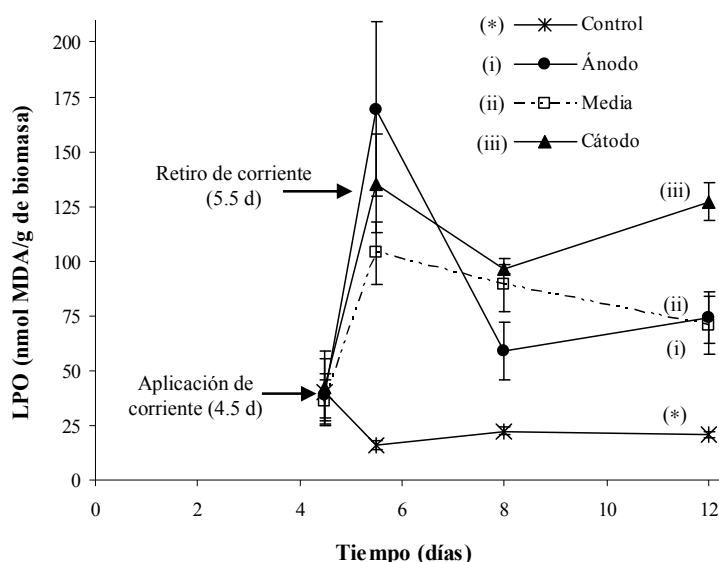
Con estos resultados se demostró, que la técnica de colorantes para determinar modificaciones en la membrana en hongos filamentosos, nos da una idea de las posibles alteraciones en la membrana por efecto de la corriente eléctrica, sin embargo existen otras técnicas para determinar modificaciones en membranas, de manera cuantitativa, como lo es la cuantificación de la producción del malondialdehído.

### *8.3.3 Efecto de la corriente eléctrica sobre la lipoperoxidación de las membranas de *A. niger**

Con la finalidad de determinar el efecto de la corriente eléctrica sobre las modificaciones en las membranas celulares de *A. niger* se cuantificó la concentración del malondialdehído (MDA), como resultado de la lipoperoxidación debido al deterioro oxidativo de los

fosfolípidos poli-insaturados de las membranas. El MDA fue cuantificado a diferentes tiempos (0, 4.5, 5.5, 8 y 12 d) y cada tiempo representa un experimento independiente.

En la Figura 8.14 se presenta la gráfica del grado de lipoperoxidación en ausencia y presencia de corriente eléctrica, medido a través del contenido de MDA (nmoles) por gramo de biomasa y respecto al tiempo de estimulación. En gráfica se puede observar mayor producción de MDA cuando se aplica la corriente eléctrica con respecto al control. Cuando se determinó la concentración del MDA antes de aplicar la corriente eléctrica a los 4.5 días de cultivo, se cuantificaron hasta  $35 \pm 7$  nmol de MDA por g de biomasa. En la CE control, después del día 5.5, se observó que la concentración de MDA presenta valores constantes e inclusive por debajo del basal ( $20 \pm 3$  nmol MDA/g biomasa) y se mantuvieron hasta el termino del cultivo.

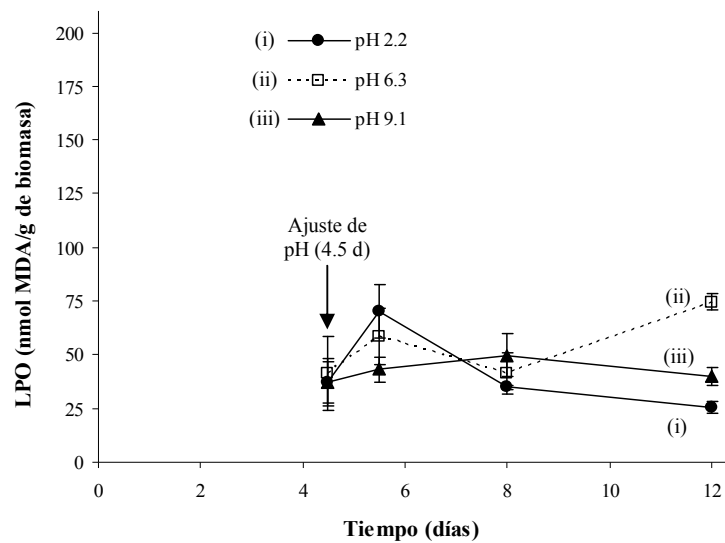


**Figura 8.14.** Efecto de la corriente sobre la concentración de MDA en *A. niger* con respecto al tiempo de tratamiento. Símbolos; (\*) Celda control (sin corriente), (i) sección anódica de la celda, (ii) sección media de la celda y (iii) sección catódica de la celda. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.

Por otro lado, cuando se aplicó la corriente eléctrica se favoreció significativamente la formación de MDA en las tres secciones de la CE, siendo en las secciones anódica y catódica (Fig. 8.14i, iii) donde se registraron concentraciones de MDA hasta 10 veces mayores con respecto al control sin corriente, observadas en el día 5.5; mientras que en la sección media se

registró menor incremento con respecto a las dos secciones anteriores (7 veces mayor respecto al control). La concentración de MDA disminuyó en el día 8 del experimento con corriente eléctrica, siendo en la sección anódica la disminución más drástica y en la sección media la disminución fue gradual. En las secciones anódica y catódica se presentaron ligeros incrementos al final del experimento (12 d).

El incremento diferencial en la concentración del MDA en cada una de las secciones de la CE, con respecto al tiempo, pueden deberse a la cantidad de especies reactivas del oxígeno (ERO) producidas por la aplicación de la corriente eléctrica y mantenerse por las condiciones de pH de cada una de las secciones de la CE. Cabe señalar que en la sección catódica se forman grupos  $\text{OH}^-$  (una de las especies más reactivas del oxígeno) a partir de la reducción del agua, por lo tanto es posible que la lipoperoxidación (medida en función de la concentración del MDA) se haya mantenido constante (Figura 8.14iii), esto debido a que la concentración de grupos  $\text{OH}^-$  se mantiene alta en esta sección a lo largo del cultivo y es la que puede ocasionar daño oxidativo en los lípidos de las membranas. Por el contrario, la disminución drástica en la concentración de MDA en la sección anódica, puede explicarse por el incremento en la concentración de protones generados a partir de la oxidación del agua, inducido por efecto de la corriente eléctrica y que mantiene el pH ácido en esta sección, de tal manera que los protones generados podrían disminuir la concentración de grupos  $\text{OH}^-$  que pueden oxidar los lípidos, disminuyendo en consecuencia la concentración de MDA. Finalmente, en la parte media de la CE se aprecia un efecto intermedio entre lo observado en las secciones anódica y catódica debido a que el pH que se genera es de 6.3, con lo que la formación de ERO disminuye gradualmente y, por tanto, la lipoperoxidación.



**Figura 8.15.** Efecto del pH sobre la concentración de MDA en *A. niger* con respecto al tiempo de tratamiento. Símbolos; (i) —●—, pH 2.2, simulando sección anódica; (ii) --□--, pH 6.3, simulando sección media; (iii) —▲—, pH 9.1, simulando sección catódica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.

Para discernir entre el efecto de la corriente y el efecto de pH sobre la producción de MDA, como medida de lipoperoxidación, se realizaron experimentos independientes ajustando el pH, con el fin de simular cada una de las secciones de la CE, tal y como se detalla en la sección 7.3.2.

En la Figura 8.15 se presentan los resultados de la producción de MDA, de los experimentos donde se ajusta el pH. En los reactores donde se ajustó el pH en 9.1 y 2.2 (sección 7.3.2) se observaron incrementos no significativos de la concentración del MDA ( $p > 0.05$ ) en el día 5,5 y posteriormente disminuyó a los valores basales durante el resto del tiempo de cultivo, con excepción del reactor ajustado a pH 6.3, donde se observó que la concentración de MDA al final del cultivo se incrementó 1.8 veces con respecto a la concentración inicial. Al contrastar estos resultados con los obtenidos en cada una de las secciones de la CE con corriente se observó lo siguiente: (a) en la sección catódica, la producción de MDA fue 3 veces mayor en presencia de la corriente eléctrica, (b) en la sección anódica fue 2.4 veces mayor en presencia

de la corriente y (c) en la sección media no se observaron diferencias significativas en la concentración de MDA con respecto al reactor a pH 6.3 y solamente al final del cultivo.

Con estos resultados se demostró que la alta concentración de MDA es debida principalmente al efecto que provoca la corriente eléctrica y no exclusivamente al pH generado por la corriente eléctrica. Al comparar nuestros resultados con otros reportados, se encontró que la concentración del MDA, es mayor para *A. niger*, en presencia de la corriente eléctrica que en presencia de metales, como el hierro o magnesio (Ayar y Tarhan, 2005).

Por lo tanto, proponemos que la corriente eléctrica es el principal responsable de las modificaciones en la membrana, posiblemente debido a la formación de las ERO que se forman de la ruptura del agua en presencia de la corriente eléctrica. Las modificaciones en los lípidos de las membranas biológicas pueden ocasionar aumento en la permeabilidad de las membranas, modificando la actividad de las proteínas, enzimas, canales iónicos asociados a enzimas, situación que puede llevar a una desestabilización estructural de la células (Konigsberg y col., 2008).

Por otro lado, se ha demostrado que en condiciones fisiológicas el campo eléctrico en la membrana (potencial de membrana) varía entre 20-200 mV dependiendo de la especie de microorganismo. Panagopoulos y col., (2000) sugieren que cuando se aplica un campo eléctrico por encima del valor mayor, la membrana puede presentar cambios que producen diferentes respuestas bioquímicas y fisiológicas, que inician en el incremento en la permeabilidad celular. En el presente estudio se demostró que durante la aplicación de corriente ( $0.42 \text{ mA/cm}^2$ , que genera un potencial de celda de 6V) durante 24 h, la formación de biomasa disminuye, mientras que las tasas de consumo de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{CO}_2$  aumentan; por lo tanto, podemos sugerir que el HXD es consumido por una menor cantidad de biomasa, y que estos cambios son ocasionados por el aumento en la permeabilidad del sustrato a través de la membrana de la célula y de esta manera se degrada mayor cantidad de HXD.

#### **8.4 Evaluación de las alteraciones metabólicas por efecto de la corriente eléctrica**

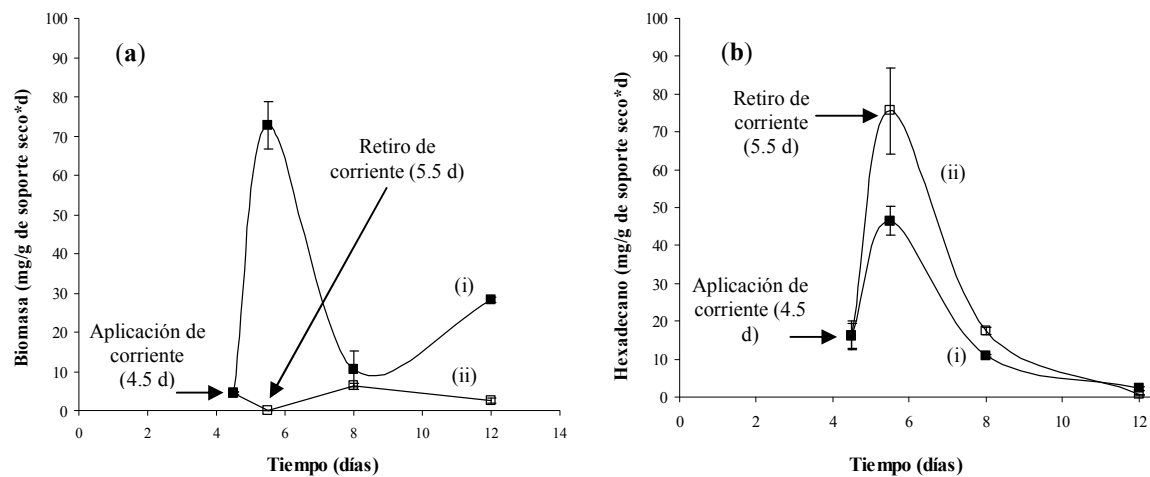
Se ha demostrado que la aplicación de una corriente eléctrica de baja intensidad (menor a  $5 \text{ mA/cm}^2$ ) puede llegar a provocar modificaciones en las mitocondrias (Vajrala y col., 2008) lo

que ocasiona cambios en el contenido celular total de ATP (Lustrato y col., 2006). Con base en estas observaciones y con la finalidad de demostrar que la corriente eléctrica altera el metabolismo mitocondrial de *A. niger* de tal manera que acelera la degradación de HXD, se calcularon las tasas de producción de biomasa, de degradación de HXD, de consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, así como el contenido celular total de ATP. Las cuáles fueron calculadas a partir de los valores promedio de las tres secciones de la celda, con el objeto de poder comparar las tasas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> con las tasas de producción de biomasa y degradación de HXD, recordando que la cuantificación de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> fueron los valores acumulados en las tres secciones de la CE.

El ATP fue cuantificado a diferentes tiempos (0, 4.5, 5.5, 8, y 12 d) y cada tiempo representa experimentos independientes.

#### *8.4.1 Tasas de producción de biomasa y degradación de HXD*

En la Figura 8.16a se muestran las tasas de producción de biomasa en ausencia y presencia de corriente eléctrica, con valor inicial de  $4.3 \pm 0.4$  (mg/g de soporte seco por día) durante los primeros 4.5 días de iniciado el experimento y que corresponde a la etapa de germinación de las esporas. Al comparar las tasas de biomasa a las 24 horas de aplicación de la corriente eléctrica (5.5 d), entre las CE con y sin corriente, se observó un aumento significativo ( $73.0 \pm 6.0$  mg/g de soporte seco por día) en la CE control, mientras que en la CE con corriente, los valores alcanzados fueron 70 veces menores con respecto al control. Estos resultados concuerdan con los presentados en la sección 8.1.1.1, donde se observó que la producción de biomasa, en presencia de la corriente eléctrica disminuye considerablemente.



**Figura 8.16.** Tasas de producción de biomasa y degradación de HXD por *A. niger*, en función del tiempo (a) tasas de producción de biomasa y (b) tasas de degradación de HXD. Símbolos: (i) -□- con corriente eléctrica y (ii) -■- sin corriente eléctrica. Cada punto representa experimentos independientes y las barras de error representan la desviación de triplicados.

Contrario a los resultados obtenidos para la producción de biomasa, las tasas de degradación de HXD fueron mayores en presencia de la corriente. En la Figura 8.16b se muestran que la tasa inicial de degradación de HXD es de  $16.2 \pm 3.8$  (mg/g d) y 24 horas después de la aplicación de la corriente se observó la mayor tasa de degradación ( $75.5 \pm 11.3$  mg/g d) con respecto a la registrada en la CE control ( $46.5 \pm 3.8$  mg/g d). A pesar de que al final del cultivo no se observaron diferencias significativas entre las tasas de degradación, en presencia y ausencia de corriente, si la hubo respecto a la degradación de HXD. Estos resultados indican que la mayor desaparición de HXD se lleva a cabo durante la aplicación de la corriente (del día 4.5 al 5.5) que es independiente de la cantidad de biomasa presente. Al comparar estos resultados con lo reportado se encuentra una clara similitud con lo publicado por Jackman y col., (2001) quienes demostraron que la aplicación de corriente ( $0.89 \text{ mA/cm}^2$ ; 21 d) al suelo contaminado favorece la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxi acético por parte de *Burkholderia* spp., con una tasa de degradación de 23 mg/g d (75%; 22 d), respecto al control (sin corriente) con una tasa de 13 mg/g d (39%; 24 d) asumiendo linealidad entre el tiempo inicial y final.

Por otro lado, al relacionar las tasas de producción de biomasa con las de degradación de HXD

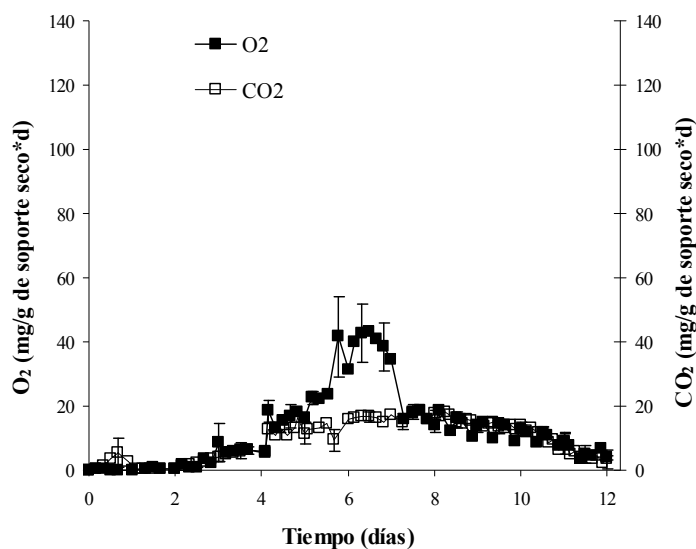


se observó que durante la aplicación de la corriente eléctrica aumentó la degradación de HXD, la cual fue generada por menor cantidad de biomasa, contrario a la CE control en la que se observó una alta tasa de producción de biomasa, asociada a una baja tasa de degradación de HXD.

#### 8.4.2 Tasas de respiración

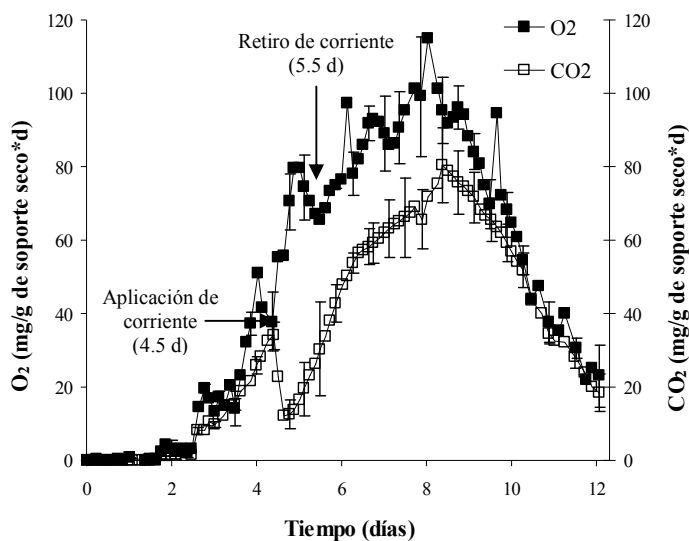
A partir de los resultados obtenidos del consumo de  $O_2$  y producción de  $CO_2$  (sección 8.2.1), se generaron las tasas de consumo de  $O_2$  y producción de  $CO_2$ . En la Figura 8.17 y 8.18 se presentan las tasas para  $O_2$  y  $CO_2$ , en presencia y ausencia de corriente eléctrica.

Durante los primeros 4.5 días, no se observaron diferencias significativas entre el consumo de  $O_2$  y la producción de  $CO_2$  en la CE control. Posteriormente, en la CE control se registró aumento en el consumo de  $O_2$  con respecto a la producción de  $CO_2$  de hasta 2.5 veces, incremento que coincide con la mayor producción de biomasa (sección 8.1.1.1), durante el mismo periodo de tiempo. Al final del cultivo, el  $O_2$  disminuye al igual que las tasas de biomasa y HXD. Estos resultados sugieren que el  $O_2$  es utilizado mayoritariamente para la producción de biomasa, mostrando que el metabolismo de *A. niger* es preferentemente anabólico en la ausencia de corriente eléctrica.



**Figura 8.17.** Tasas de consumo de  $O_2$  y  $CO_2$ , después de 12 días de cultivo en experimentos sin corriente eléctrica. Las barras de error representan la desviación estándar en tres réplicas de los análisis.

Por otro lado, durante la aplicación de la corriente la tasa de consumo de O<sub>2</sub> aumentó (3.6 veces) y la tasa de producción de CO<sub>2</sub> disminuyó hasta 2 veces con respecto al control. Al correlacionar estos resultados con el consumo de HXD en el mismo periodo de tiempo, se observó que a pesar de que desaparece rápidamente el HXD, éste no es biotransformado inmediatamente. Este resultado sugiere que la desaparición de HXD durante la aplicación de la corriente eléctrica, puede deberse a un fenómeno de permeabilidad alterada de la membrana de *A. niger* ya que el HXD se podría estar incorporando a las membranas del micelio de *A. niger* durante la aplicación de la corriente, sin ser metabolizado o podría ser almacenado temporalmente en el citosol. Algunos estudios apoyan la idea de que la corriente eléctrica afecta la orientación de los lípidos de la membrana y, en algunas ocasiones, modifican la permeabilidad y la regulación de la misma (Groves y col., 1998, Ranalli y col., 2002, Jackman y col., 2001, Spilimbergo y col., 2003).



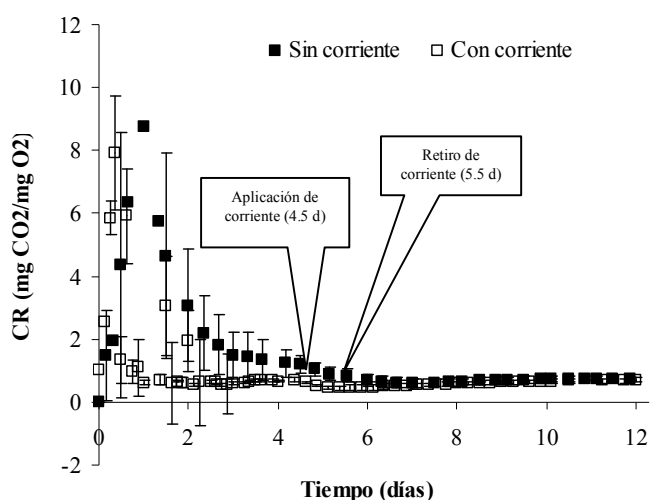
**Figura 8.18.** Tasas de consumo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, después de 12 días de cultivo en experimentos con corriente eléctrica. Las barras de error representan la desviación estándar en tres réplicas de los análisis.

Por otro lado, después de retirar la corriente se registraron las mayores tasas de consumo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> ( $89.6 \pm 12.1$ ,  $59.6 \pm 11.2$  mg/g d, respectivamente) respecto al control ( $29.1 \pm 8.5$ ,  $16.5 \pm 3.6$  mg/g d, respectivamente), estos resultados indican que la mineralización del HXD, se produce después de retirar la corriente, sugiriendo que el O<sub>2</sub> consumido es utilizado para la

oxidación del HXD y, en menor proporción, para la formación de biomasa. Estos resultados indican que a pesar de la modificación de las membranas, provocadas por la corriente eléctrica, las células siguen siendo viables para llevar a cabo el metabolismo.

#### 8.4.3 Coeficiente respiratorio

El coeficiente respiratorio proporciona información relacionada al metabolismo endógeno o respiratorio durante la degradación de HXD, aunque esto también depende de los niveles de oxidación del sustrato y de las condiciones de cultivo (Volke, y col. 2003).



**Figura 8.19.** Coeficiente respiratorio (C.R) de *A. niger*, con y sin corriente eléctrica, durante la degradación de HXD.

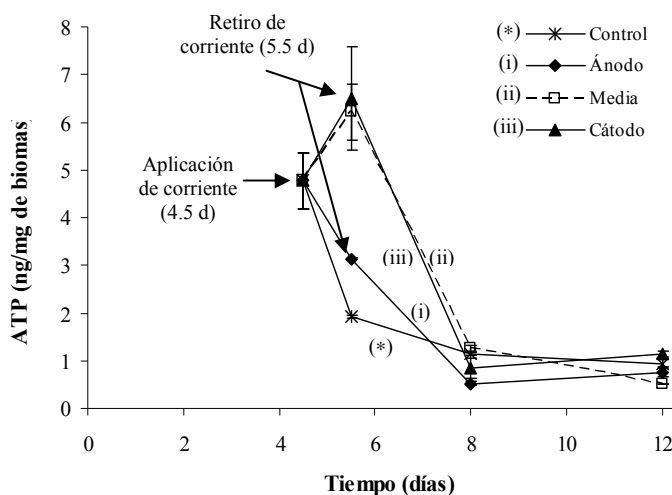
En la Figura 8.19 se presenta el coeficiente respiratorio, estos resultados fueron obtenidos a partir de la relación entre el CO<sub>2</sub> producido, y el O<sub>2</sub> consumido durante 12 días de cultivo (mg/g de soporte). A partir del día 4, no se observó diferencias significativas entre los coeficientes respiratorios, en presencia y ausencia de la corriente eléctrica, manteniéndose constantes ( $0.58 \pm 0.08$  -  $0.77 \pm 0.18$ , respectivamente). Durante este tiempo (4-12 d) el coeficiente respiratorio corresponde al consumo de HXD como fuente de energía y carbono para el hongo. Estos resultados indican que la mayor parte el O<sub>2</sub> consumido es utilizado para la formación de biomasa y/o producción de metabolitos y, en menor cantidad, para la producción de CO<sub>2</sub> como respuesta de la mineralización del HXD. Sin embargo, al relacionar

estos resultados con los balances de carbono y rendimientos (sección 8.2.2, Tabla 8.2), se observó que los coeficientes respiratorios, concuerdan con los balances y rendimientos de la CE control. Mientras que, en los tratamientos con corriente, los resultados se contradicen.

De acuerdo al balance estequiométrico realizado (sección 8.2.2), asumimos que no queda claro los coeficientes respiratorios con el consumo de Oxígeno, en la CE con corriente. De acuerdo a la estequiometría obtenida experimentalmente, es claro que el oxígeno es utilizado principalmente para la formación de biomasa en los experimentos control, mientras que, en los experimentos con corriente, el oxígeno es utilizado para la mineralización del sustrato. Con estos resultados podemos asumir que el coeficiente respiratorio no es un resultado que proporcione certeza del tipo de metabolismo que este llevando a cabo el hongo al ser sometido a una corriente eléctrica.

#### 8.4.4 Cinéticas del contenido total de ATP

El contenido total de ATP fue evaluado con la finalidad de determinar los cambios energéticos de la actividad metabólica durante y después de la aplicación de la corriente eléctrica (Guillou y col., 2003).



**Figura 8.20.** Contenido Total de ATP en *A. niger*, en función del tiempo, con y sin corriente eléctrica. Símbolos: (\*) Celda control (sin corriente), (i) sección anódica de la celda, (ii) sección media de la celda y (iii) sección catódica de la celda. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas de los análisis y cada tiempo representa un experimento independiente.

En la Figura 8.20 se presenta el contenido total de ATP en los experimentos en ausencia y presencia de corriente eléctrica, en función del tiempo. Antes de la estimulación con corriente no se observaron diferencias significativas entre el contenido total de ATP con y sin corriente. Al final del cultivo, en la CE control disminuyó 61% del contenido total de ATP con respecto al contenido inicial. Mientras que en la CE con corriente, 24 h después de aplicar la corriente (5.5 d), la concentración de ATP incrementó significativamente por efecto de la corriente eléctrica. En la sección media y catódica no se observaron diferencias significativas entre ellas, siendo estas dos secciones las de mayor contenido total de ATP (3.3 veces más, respecto a la CE control). Mientras que la sección anódica se observó menor cantidad de ATP (2.2 veces) con respecto a las dos secciones anteriores; no obstante, el contenido total de ATP fue 1.6 veces mayor respecto a la CE control.

Estos resultados fortalecen la idea de que el efecto de la corriente eléctrica modifica la actividad metabólica de *A. niger*. Aunque estas diferencias son mayores al retirar la corriente, al final del cultivo (12 d) no se encontraron diferencias significativas entre las CE con y sin corriente. Este efecto se podría correlacionar con el aumento en la degradación de HXD y la inhibición en la producción de biomasa observadas en las mismas secciones de la CE, en el mismo período de tiempo; es decir, que es posible proponer que la aplicación de la corriente eléctrica estimula las mitocondrias para que produzcan mayor cantidad de ATP, el cual es utilizado principalmente para la mineralización del HXD, más que para la síntesis de biomasa y que a partir del día 8 de cultivo el HXD, utilizado como fuente de energía, se ha agotado y el equilibrio celular se reestablece, hipótesis que es sustentada en los reportes de Vajrala y col., (2008) quienes utilizando un modelo de tres membranas (simulando una mitocondria), proponen que la aplicación de bajos voltajes induce modificaciones, en la membrana externa de la mitocondria.

Con respecto al incremento en la concentración intracelular de ATP por efecto de la corriente eléctrica, se conocen reportes donde se ha demostrado la estimulación en el contenido total de ATP después de aplicar una corriente de baja intensidad ( $5.3 \text{ mA/cm}^2$ ) en *Bacillus cereus* (Valle y col., 2007). Lustrato y col., (2006) observaron que el contenido total de ATP aumentó después de la aplicación de la baja intensidad de corriente en *S. cerevisiae*, contrario a lo

observado por Guillou y col., (2003) quienes observaron una disminución del ATP al aplicar una corriente eléctrica, utilizando el mismo microorganismo. Con estos resultados se demostró que la corriente eléctrica, no sólo provoca modificaciones morfológicas y alteraciones en la membrana, situaciones que se pueden considerar como las principales causas del aumento en la permeabilidad de la membrana, además de estimulación y cambios en el metabolismo, resultados demostrados con los balances de carbono y finalmente, los resultados de ATP, proporcionan la información suficiente para sugerir que estos cambios observados en el metabolismo de *A. niger* durante la aplicación de la corriente eléctrica, son atribuidos a alteraciones a nivel mitocondrial ya que ésta es el centro de control para la degradación aeróbica de substratos energéticos en función de la utilización del O<sub>2</sub> para producir grandes cantidades de ATP.

A partir de todos los resultados presentados podemos proponer que la corriente eléctrica afecta la integridad y permeabilidad de las membranas plasmáticas de *A. niger* y las mitocondrias, ocasionando que el metabolismo sea principalmente catabólico, con lo que el consumo de oxígeno es alto, la degradación de HXD aumenta drásticamente hasta formar CO<sub>2</sub>, el cual se produce en la matriz mitocondrial a partir de la descarboxilación del isocitrato y  $\alpha$ -cetoglutarato, lo que genera aumento en la síntesis de ATP, mientras que la utilización de estos precursores para la formación de biomasa (anabolismo) pudiera estar disminuida considerablemente. Finalmente, el aumento en el consumo de oxígeno atómico en la cadena respiratoria de la mitocondria podría estar generando altas concentraciones de las especies reactivas de oxígeno, lo que ocasiona incremento en la lipoperoxidación, ocasionando un aumento en la permeabilidad de la membrana. No obstante, la integración de datos en la literatura pone de manifiesto la falta de información sobre los efectos que ocasionan los campos eléctricos respecto a las alteraciones en el metabolismo. De esta manera, a pesar de las evidencias experimentales que proporciona este trabajo, sobre la modificación del ciclo de Krebs, no es posible establecer con exactitud, cuál de las etapas es la que se modifica con la corriente eléctrica. Esta es la perspectiva que deja abierta la investigación desarrollada en este trabajo.

## **9. Conclusiones**

En el presente trabajo, se estudió la alteración en el metabolismo de *Aspergillus niger* frente a una corriente eléctrica controlada de baja intensidad, durante la degradación de HXD en un sistema modelo. Se demostró, que la aplicación de  $0.42 \text{ mA/cm}^2$  (con un potencial de celda de 6V), durante 24 h, en la fase de crecimiento micelial de *A. niger*, provocó un aumento transitorio en la permeabilidad de la membrana, estimulando el libre acceso del sustrato hacia el interior de la célula. Este fenómeno no sólo propició un aumento en la degradación de HXD, sino que se favoreció el metabolismo catabólico. Estas conclusiones fueron sustentadas en base a la disminución de biomasa, el incremento en la producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de oxígeno, obtenidos en presencia de corriente, en comparación con el control (sin corriente). Por otro lado, nuestros resultados indican que el cambio en el metabolismo de *A. niger* al ser sometido a la corriente, es atribuido a alteraciones a nivel mitocondrial, independientemente de los cambios de pH generados por la corriente.

En resumen el presente trabajo contribuye al conocimiento de los efectos de la corriente en el metabolismo de un hongo filamentoso como *Aspergillus niger*, abriendo la posibilidad de manipular el metabolismo de un microorganismo de interés biotecnológico mediante el uso de una corriente eléctrica de baja intensidad.



## **10. Perspectivas**

Un aspecto importante en el seguimiento del efecto de la corriente eléctrica en las alteraciones en el metabolismo de *Aspergillus niger*, sería lo siguiente:

- I. Eliminar los cambios de pH ocasionados por la corriente. Esto se puede hacer cambiando las soluciones electrolíticas de los pozos. Colocando una solución ácida en el compartimento catódico y una solución alcalina en el compartimento anódico.
- II. Determinar la permanencia de los cambios metabólicos en *Aspergillus niger* después de retirar la corriente eléctrica. Esto se puede realizar utilizando biomasa previamente estresada con corriente eléctrica, adicionando medio de cultivo fresco y HXD, evaluando degradación de HXD, UFC y número de esporas, con sus respectivos controles.
- III. Evaluar el efecto de la corriente eléctrica en suelo, en presencia de un consorcio microbiano.

## **11. Referencias bibliográficas**

- Acar Y. B., Alshawabkeh A. N. 1993. Principles of electrokinetic remediation. *Environmental Science and Technology*. **27**: 2638-2647.
- Aravantinos-Zafirios G., Tzia C., Oreopoulou V., Thomopoulos C. D. 1994. Fermentation of orange processing wastes for citric acid production. *J. Sci Food Agric*. **65**: 117-120.
- Astumian D. R. 1993. Effects of time-dependent electric fields on membrane transport. *Biophys. J*. **64**: 7-8.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev*. **45**: 180- 209.
- Ayar K. H., Tarhan L. 2005. Variations in metal uptake, antioxidant enzyme response and membrane lipid peroxidation level in *Fusarium equiseti* and *F. Acuminatum*. *Process Biochemistry* **40**: 1783-1790
- Barreto R. V. G., Hissa D.C., Paes F. A., Grangeiro T.B., Nascimento R. F., Rebelo L. M., Craveiro A. A., Melo V. M. M. 2010. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. *Bioresour Technol*. **101**: 2121-2125.
- Bauer H., Kasper-Giebl A., Zibuschka F., Hitzemberger R., Kraus G. F., Puxbaum H. 2002. Determination of the carbon content of airborne fungal spores. *Anal. Chem*. **74**: 91-95
- Bawcom D. W., Thompson L. D., Miller M.F., Ramsey C.B. 1995. Reduction of microorganisms of beef surfaces utilizing electricity. *J. Food Protect*. **58**: 35-38.
- Belehradek M., Domenge C., Luboinski B., Orłowski S., Behraderk J., Mir L. M. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment; first clinical phase I– II trial. *Cancer*. **72**: 3694-3700.
- Bianchi, A., Zambonelli, A., Zechini D'Aulerio, A., Bellesia, F. 1997. Ultrastructural Studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi in vitro. *Plant Dis*. **81**:1241-1246.
- Bouwer E. J., Zehnder A. J. B. 1993. Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnol*. **11**: 360-367.

- Bravo O., Ferrer A., Aiello C., Ledesma A., Davila M. 1994. Growth of *Chaetomium cellulolyticum* in solid-state fermentation of sugar cane bagasse treated with water and alkali at several liquid/solid ratios *Biotechnol. Lett.* **16**: 865-870.
- Buege J. A., Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* **52**: 464-478.
- Capotorti G., Digianvincenzo P., Cesti P., Bernardi A., Guglielmetti G. 2004. Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation.* **15**: 79-85.
- Chávez-Gómez B., Quintero R., Esparza-García F., Mesta-Howard A. M., Zavala Díaz de la Serna F. J., Hernández-Rodríguez C. H., Gillén T., Poggi-Varaldo H. M., Barrera-Cortés J., Rodríguez-Vázquez R. 2003. Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresour Technol.* **89**: 177-183.
- Christen P., Auria R., Villegas E., Revah S. 1993. Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances.* **11**: 549-557.
- Corlay C. L., Ferrera-Cerrato R., Etchevers Barra J. D., Echegaray A. A., Santizo R. J. A. 1999. Microbial groups kinetics of composting and vermicomposting processes. *Agrociencia.* **33**: 375-380.
- Coster Hans G. L., Chilcott Terry C. 2002. Electric field effects in proteins in membranes. *Bioelectrochemistry.* **56**: 141-146
- Covino S., Svobodová K., Krěsinová Z., Petruccioli M., Federici F., D'Annibale A., Cvcárová M., Cajthaml T. 2010. In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresour. Technol.* **101**: 3004-3012.
- d'Enfert C. 1997. Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology.* **21**: 163-172
- David Helga, Åkesson Mats, Nielsen Jens. 2003. Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.* **270**: 4243-4253

- Díaz-Ramírez I., Ramírez-Saad H., Gutiérrez-Rojas M., Favela-Torres E. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Can. J. Microbiol.* **49**: 755-761.
- Díaz-Ramírez I. J. 2004. Biodegradación de hidrocarburos por cultivos mixtos definidos aislados de la rizósfera de *Cyperus Laxus* Lam. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Dzul-Puc J. D., Esparza-García F., Barajas-Aceves M., Rodríguez-Vázquez R. 2005. Benzo(a)pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere.* **58**: 1-7.
- Escalante-Espinosa E., Gallegos-Martínez M. E., Favela-Torres E. y Gutiérrez-Rojas M. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere.* **59**: 405-413.
- Ganeva, V., Galutzov, B., Teissie, J., 2002. Electroinduced release of invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **24**: 1853–1856.
- Gehl J. 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* **177**: 437-447.
- Golzio M., Rols M. P., Teissie J. 2004. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods.* **33**: 126-135.
- Gothelf A., Mir L. M., Gehl J. 2003. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat. Rev.* **29**: 371-387.
- Groves J. T., Boxer S. G., McConnell H. M. 1998. Electric field-induced critical demixing in lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 935 -938
- Guillou S., Besnard V., El Murr N., Federighi M., 2003. Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to low amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 85-89.

- Guillou, S., El Murr, N., 2002. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in solution by low-amperage electric treatment. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 860–865.
- Gutiérrez-Rojas M., Córdova J., Auria R., Revah S., Favela-Torres E. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid-state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.* **17**:219-224.
- Hernández Zamora M. A. 2009. Estudio de la acumulación de plomo y cadmio por *Asphodelus fistulosus* y *Brassica juncea* L. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Hyo-Sang L., Lee K. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soil by bacterial cells transported by electrokinetics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 1038-1045.
- Jackman A. S., Maini G., Sharman K. A., Sunderland G., Knowles J. C. 2001. Electrokinetic movement and biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in silt soil. *Biotechnol. Bioeng.* **74**: 40-48.
- Jackman, A.S., Maini, G., Sharman, K.A., Knowles, J.C., 1999. The effects of direct electric current on the viability and metabolism of acidophilic bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 316–324.
- Jeong J., Kim J. Y., Yoon J. 2006. The role of reactive oxygen species in the electrochemical inactivation of microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 6117-6122
- Jerábková H., Králová B., Krejčů V., Sanchez J. L. I., Roig M. G. 1997. Use of polyurethane foam for the biodegradation of n-alkanes by immobilised cells of *Pseudomonas*. *Biotechnology Techniques.* **11**: 391-394.
- Jong-Chul P., Min Sub L., Dong Hee L., Bong Joo P., Dong-Wook H., Masakazu U., Kosuke T. 2003. Inactivation of Bacteria in Seawater by Low-Amperage Electric Current. *Appl. Environ Microbiol.* **69**: 2405–2408.
- Kim S-O., Moon S-H., Kim K-W. 1999. Enhanced electrokinetic soil remediation for removal of organic contaminants. *Environ. Tech.* **21**:417-426.

- Konigsberg F. M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas, en: Zenteno S. T., Saldaña B. Y. Daño a lípidos. *Ed. El Manual Moderno*, México D.F., pp. 135-146.
- Kucsera J., Yarita K., Takeo K. 2000. Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J. Microbiol. Methods* **41**: 19-21
- Larroche C. 1996. Microbial growth and sporulation behaviour in solid-state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* **5**: 408-423.
- Lear, G., Harbottle, M.J., van der Gast, C.J., Jackman, S.A., Knowles, C.J., Sills, G., Thompson, I.P., 2004. The effect of electrokinetics on soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **36**: 1751–1760.
- Liu D. S., Astumian R. D, Tsong T. Y. 1990. Activation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> pumping modes of (Na,K)-ATPase by an oscillating electric field. *J. Biol. Chem.* **265**: 7260-7265.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2003. *Biología Celular y Molecular*. 4ta edición. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 1084p.
- Lowry, O. H., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
- Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., Ranalli, G., 2006. Scaling-up in industrial winemaking using low electric current as an alternative to sulfur dioxide addition. *J. Appl. Microbiol.* **101**: 682–690.
- Moore-Landecker, E. 1996. *Fundamentals of the Fungi*. 4a ed. Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 574p.
- More T. T., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R. Y. 2010. Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresour Technol.* **101**: 7691-7700.
- Murado M. A., González M. P., Torrado A., Pastrana L. M. 1997. Amylase production of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Process. Biochem.* **32**: 35-42.



- Ooijkaas L. P., Weber F. J., Buitelaar R. M., Tramper J., Rinzema A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Tibtech.* **18**: 356-360.
- Orlowski S., Mir L. M. 1993. Cell electropermeabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **1154**: 51-63.
- Ozawa S., Sato K., Endo I. 1996. Repeated batch production of alkaline protease by solid-state fermentation using urethane foam as carriers. *Bioprocess. Eng.* **14**: 63-68.
- Palaniappan, S., Sastry, S.K., Richter, E.R., 1992. Effect of electroconductive heat treatment and electrical pretreatment on thermal death kinetics of selected microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 225-232.
- Pamukcu S., Wittle J.K. 1993. Electrokinetically enhanced insitu soil decontamination, in Remediation of hazardous waste Contaminated Soils, Marcel Dekker, Inc., New York., pp 245-294
- Panagopoulos, D. J., Messini, N., Karabarbounis, A., Philippetis, A. L., Margaritis, L. H. 2000. A mechanism for action of oscillating electric fields on cell. *Biochemical and Biophysical Resource Comment.* **272**: 634-640.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* **13**: 81-84.
- Prashant M. Bapat., Sucharita Kundu, Pramod P. Wangikar. 2003. An optimized method for *Aspergillus niger* spore production on natural carrier substrates. *Bitechnol Progress.* **19**: 1683-1688.
- Prince, R. C. 2003. Biodegradation of petroleum and other hydrocarbons. Encyclopedia of Environmental Microbiology. Publicado en internet por: John Wiley & Sons, Inc. New Jersey (<http://www.mrw.interscience.wiley.com>).
- Raghavarao K. S. M. S., Ranganathan T. V., Karanth N. G. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**: 127-135.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Elect. J. Biotechnol.* **1**:174-188.

- Rama-Mercier, R., Mougin C., Sigoillot J-C., Sohier L., Chaplain V., Asther M. 1998. Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Techniques*. **12**: 725-728.
- Ranalli, G., Iorizzo, M., Lustrato, G., Zanardini, E., Grazia, L., 2002. Effects of low electric treatment on yeast microflora. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 877–883.
- Rojas, Loria C. C. 2010. Efecto de la interacción hongo-*Dodonaea viscosa* L. Jacq en la fitorremediación de plomo en un sistema in Vitro. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rordam Andersen M., Lyng Nielsen M., Nielsen J. 2008. Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Mol Syst Biol.* **4**: 1-13.
- Roulia M., Chassapis K., Fotinopoulos CH., Savvidis TH. y Katakis D. 2003. Dispersion and sorption of oil spills by emulsifier-modified expanded perlite. *Spill Science & Technology Bulletin.* **8**: 425-431.
- Sale, A. J. H., Hamilton, W. A. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms 1. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **148**: 781-788
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J. C., van Dijck P. W. M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 426-435.
- Setti L., Lanzarini G., Pifferi P. G., Spagna G. 1993. Further research into aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* sp. *Chemosphere.* **26**: 1151-1157.
- Shapiro A. P., Probstein R. F. 1993. Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 283-291.
- Shin, H.S., Zeikus, J.G., Jain, M.K., 2002. Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 476–481

- Silman, R.W., Bothast R.I., Schisler D.A. 1993. Production of *Colletotrichum truncatum* for use as a mycoherbicide: effects of culture drying and storage on recovery and efficacy. *Biotechnol. Adv.* **11**: 561-575.
- Socol C. R. 1996. Aplicaciones agroindustriales de los procesos de fermentación en medio sólido. En: Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. De. Galindo, E. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Pág. 346-358.
- Spilimbergo S., Dehghani F., Bertucco A. y Foster N. R. 2003. Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature. *Biotechnol Bioeng.* **82**: 118-125.
- Sugiura K, Ishihara M., Shimauchi T., Harayama S., 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 45-51.
- Sun Jibin, Lu Xin, Rinas Ursula, Ping Zeng An. 2007. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biology.* **8**:R182.
- Teissié J., Eynard N., Vernhes M. C., Be' nichou A., Ganeva V., Galutzov B., Cabanes P. A. 2002. Recent biotechnological developments of electropulsation, a prospective review. *Bioelectrochemistry.* **55**: 107-112.
- Teissie J., Golzio M., Rols M. P. 2005. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1724**: 270-280.
- Thrash J. C., Coates J. D. 2008. Review: direct and indirect electrical stimulation of microbial metabolism. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 3921-3931.
- Tissot B. P., Welte D. H. 1984. Petroleum formation and occurrence. Ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Tran Ch. T., Mitchel D.A. 1994. Pineapple waste - A novel substrate for citric acid production by solid state fermentation. *Biotechnol. Letters.* **17**: 1107-1101.

USEPA, 1996. ASW-846, Test Methods for Evaluating Solid Wastes Physical/Chemical Methods, EPA methods 3540 and 8100, third Ed. Environmental Protection Agency, Washington DC.

Vajrala, V., Claycomb, J.R., Sanabria, H., Miller Jr., J.H., 2008. Effects of oscillatory electric fields on internal membranes: an analytical model. *Biophys. J.* **94**: 2043-2052.

Valle, A., Zanardini, E., Abbruscato, P., Argenzio, P., Lustrato, G., Ranalli, G., Sorlini, C., 2007. Effects of low electric current (LEC) treatment on pure bacterial cultures. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 1376–1385.

Van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B. 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation. Review. PubMed PMID: 7532480.* **5**:161-74.

Van Cauwenberghe L. 1997. Electrokinetics technology evaluation reports TO-97-03. GWRTAC E Series. USA. <http://www.gwrtac.org>.

Velasco-Alvarez N., González I., Damian-Matsumura P., Gutiérrez-Rojas M. 2010. Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2010.07.111

Velasco-Alvarez. N., 2006. Efecto de un campo eléctrico en la degradación de Hexadecano por *Aspergillus niger* en un soporte inerte. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana.

Virkutyte J., Sillanpaa M., Latostenmaa P. 2002. Electrokinetic soil remediation - critical overview. *The Science of the Environment.* **289**: 97-121.

Volke Sepúlveda T. L., Gutiérrez-Rojas M., Favela-Torres E. 2003. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol.* **87**: 81–86.

Volke Sepúlveda, T.L., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E., 2006. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresour. Technol.* **97**: 1583-1591.

- Wackett L. P., Brusseau G. A., Hueseholder S. R., Hansen R. S. 1989. Survey of microbial oxygenase: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2960-2964.
- Wolf H., Rols M.P., Neumann E., Teissie J. 1994. Control by pulse parameters of electric field mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* **66**: 524-531.
- Xin-gang L., Tao W., Jin-sheng S., Xin H., Xiao-song K. 2006. Biodegradation of high concentration phenol containing heavy metal ions by functional biofilm in bioelectro-reactor. *J. Environ. Sci.* **18**: 639-643.
- Zanardini E., Valle A., Gigliotti C., Papagno G., Ranalli G., Sorlini C. 2002. Laboratory-scale trial of electrolytic treatment on industrial wastewaters: microbiological aspects. *J. Environ. Sci. Health Pt A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* **37**: 1463-1481.
- Zhu Y. , Smits J.P., Knol W., Bol Tno J. 1994. Polyurethane foam as a novel support for solid state fermentation. *Biotech. Letters.* **16**: 643-648.

## **12. Anexos**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00083

Matrícula: 206380670

ALTERACION EN EL METABOLISMO DE *Aspergillus niger* EXPUESTO A UNA CORRIENTE ELECTRICA, DURANTE LA DEGRADACION DE HEXADECANO

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 10 del mes de marzo del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA  
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA  
DRA. MERCEDES TERESITA OROPEZA GUZMAN  
DR. IGNACIO GONZALEZ MARTINEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: NANCY VELASCO ALVAREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



NANCY VELASCO ALVAREZ  
ALUMNA

REVISÓ  
*[Signature]*

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO  
CASTAÑEDA

VOCAL

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL

DRA. MERCEDES TERESITA OROPEZA  
GUZMAN

SECRETARIO

DR. IGNACIO GONZALEZ MARTINEZ