



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Iztapalapa

“Biodegradación de altas concentraciones de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía por *Aspergillus terreus* en cultivo sólido”

T E S I S

Propuesta para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

P R E S E N T A :

Ana Luisa Bravo de la Garza

DIRECTOR:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

ASESORES:

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Dr. Ernesto Favela Torres

MEXICO, D.F.

Octubre, 2005

“La Maestría 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.**”

Iztapalapa, D.F. a 24 de Noviembre de 2005

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

“Biodegradación de altas concentraciones de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía por *Aspergillus terreus* en cultivo sólido”

PRESENTÓ

IBI Ana Luisa Bravo de la Garza

Director:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Jurado:

Dra. Araceli Tomasini Campocosio (Presidente)

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Dr. Ernesto Favela Torres (Secretario)

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

Dra. Tania Volke Sepúlveda (Vocal)

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. Inés García Peña (Vocal)

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología
Instituto Politécnico Nacional

*Ta' me' buioch diot as dochunamh
Tugaim mo chroí duit go deo
Gráim thú*

*Te estoy muy agradecida
Tienes mi corazón por siempre
Gráim thú*

*Largo es el camino de la enseñanza por medio de teorías;
breve y eficaz por medio de ejemplos.*

Lucio Anneo Séneca

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

A cheud sgeul air fear an taighe, is sgeul gu láth' air an aoidh

(La primera historia es contada por el anfitrión y los cuentos hasta la mañana siguiente por el invitado)

Mariano, Tania, Alex y Ernesto, gracias por invitarme a participar en tan genial aventura

Cha shoirbh triubhas a chur air cat

(No es fácil ponerle pantalones a un gato)

Gracias a la Dra. Inés García y a la Dra. Araceli Tomasini, por sus valiosos comentarios y consejos durante la revisión de esta tesis

Cha dual griann gan sgaile

(Usualmente no hay sol sin sombra)

Gracias a los amigos y compañeros de laboratorio que hicieron desaparecer la sombra durante este camino: Liliana, Laura, Diego, Abril, Eri, Ilde, Alex, Nancy, Adriana, Nacho, Wendy, Lauri, Memo, Manuel, Guille, Jorge

An neach nach cinn na chadal, cha chinn e na dhuisg

(Aquel que no prospera dormido, no prosperará despierto)

Gracias Jesús, Félix, Gerardo, Mónica, Mitsuo, Victor, Inés, Lilus, LÍ, Tristán por vivir y soñar junto a mí

Bior a d'hórn na fáisg; easbhuidheachd ri d' námhaid na ruisg; ri gearradh-sgran a d'fheol na eisd; beisd nimheil ri d' bheó na duisg

(Una espina en tu conocimiento, no te agobiará; no desearás la desnudez de tu enemigo; la punta de las dagas no verá tu piel; un reptil venenoso no te exaltará)

Madre gracias por darme las herramientas, el valor y la fuerza

Un agradecimiento especial por su ayuda durante la realización de mi tesis a Carmen Fajardo, al Dr. Angel Escobar y a Violeta Luna

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

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	x
INDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)	4
1.2 Benzo(a)pireno	8
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas	8
1.2.2 Producción y presencia en el ambiente	9
1.2.2.1 BaP en la atmósfera	10
1.2.2.2 BaP en suelos.....	11
1.2.2.3 BaP en plantas	12
1.2.2.4 BaP en sedimentos.....	13
1.2.2.5 BaP en organismos marinos.....	14
1.2.3 Toxicidad	16
1.3 Biodegradación de benzo(a)pireno	18
1.3.1 Biodegradabilidad	18
1.3.2 Factores limitantes en la biodegradación de BaP	25
1.3.3 Metabolismo microbiano del BaP.....	27
1.3.3.1 Bacterias.....	29
1.3.3.2 Hongos ligninolíticos	31
1.3.3.3 Hongos no ligninolíticos	33
1.4 Características de los hongos filamentosos estudiados.....	35
1.5 Cultivo sólido y cultivo líquido	38
2 JUSTIFICACIÓN	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo General	45
3.2 Objetivos Particulares	45

4	HIPOTESIS	46
5	MATERIALES Y MÉTODOS	47
5.1	Microorganismos.....	47
5.2	Preparación de inóculo	47
5.3	Medios de cultivo y soluciones de BaP	48
5.4	Cultivo sólido.....	49
5.4.1	Espuma de poliuretano	49
5.4.2	Agrolita.....	51
5.5	Cultivo líquido	52
5.6	Biodegradación de carbono soluble	52
5.7	Actividad deshidrogenasa	53
5.8	Métodos analíticos	53
5.8.1	Determinación de BaP	54
5.8.2	Determinación de CO ₂	54
5.8.3	Mineralización de BaP	54
5.8.4	Determinación de glucosa	55
5.8.5	Determinación de carbono soluble.....	55
5.8.6	Determinación de biomasa	56
5.9	Obtención de tasas de consumo y producción	57
5.10	Análisis estadístico.....	57
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1	Biodegradación de benzo(a)pireno por hongos filamentosos en espuma de poliuretano	58
6.1.1	Efecto de la glucosa en la biodegradación de BaP.....	58
6.1.2	Efecto de la relación C/N en la biodegradación de BaP	61
6.1.3	Conclusiones parciales	63
6.2	Biodegradación de benzo(a)pireno por <i>Aspergillus terreus</i> en espuma de poliuretano	64
6.2.1	Producción de biomasa y carbono soluble	64
6.2.2	Producción de CO ₂	68
6.2.3	Biodegradación de benzo(a)pireno.....	70
6.2.4	Balance de carbono	73

6.2.5	Conclusiones parciales	75
6.3	Biodegradación de benzo(a)pireno por <i>Aspergillus terreus</i> en agrolita.....	75
6.3.1	Producción de biomasa y carbono soluble	75
6.3.2	Cinética de producción de CO ₂ y mineralización	78
6.3.3	Biodegradación de benzo(a)pireno	79
6.3.4	Balance de carbono y actividad respiratoria	81
6.3.5	Conclusiones parciales	83
6.4	Biodegradación de benzo(a)pireno por <i>Aspergillus terreus</i> en cultivo líquido.	84
6.4.1	Producción de biomasa y carbono soluble	84
6.4.2	Cinética de producción de CO ₂ y mineralización	86
6.4.3	Biodegradación de benzo(a)pireno	87
6.4.4	Balance de carbono y actividad respiratoria	89
6.4.5	Conclusiones parciales	91
6.5	Biodegradación de compuestos hidrosolubles por <i>Aspergillus terreus</i>	91
6.5.1	Conclusiones parciales	95
6.6	Actividad deshidrogenasa	96
6.6.1	Actividad deshidrogenasa en la biodegradación de compuestos hidrosolubles	97
6.6.2	Efecto de la concentración inicial de BaP en la actividad deshidrogenasa.....	99
6.6.3	Conclusiones parciales	101
7	CONCLUSIONES GENERALES	103
8	RECOMENDACIONES	105
9	REFERENCIAS	106
APÉNDICE I Hoja de datos de seguridad del benzo(a)pireno.....		118
APÉNDICE II Hoja de datos de seguridad del diclorometano		123
APÉNDICE III Glosario		129

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de los HAP contenidos en la norma de la EPA	7
Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas del BaP	9
Tabla 1.3 Concentración de BaP detectado en varias muestras atmosféricas.....	10
Tabla 1.4 Concentración de BaP en suelos	12
Tabla 1.5 BaP en tejidos de plantas comestibles	13
Tabla 1.6 Concentraciones de BaP en sedimentos.....	14
Tabla 1.7 Concentraciones de BaP en organismos marinos.....	15
Tabla 1.8 Efecto de la administración de BaP en animales experimentales	17
Tabla 1.9 Biodegradación de BaP en cultivo líquido por hongos ligninolíticos y no ligninolíticos.....	21
Tabla 1.10 Biodegradación de BaP en cultivo sólido por hongos ligninolíticos y no ligninolíticos.....	23
Tabla 5.1 Composición de los distintos medios de cultivo	49
Tabla 6.1 Biodegradación de BaP en presencia y ausencia de glucosa en cultivos sólidos (EPU) y 0.5 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ iniciales después de 15 días de cultivo.....	59
Tabla 6.2 Producción de biomasa y carbono soluble en ausencia y presencia de extracto de levadura con concentraciones iniciales de 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ en cultivo sólido (EPU) después de 7 días de cultivo	65
Tabla 6.3 Biodegradación de BaP por <i>A. terreus</i> en ausencia y presencia de extracto de levadura, con concentraciones iniciales de 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ en cultivo sólido (EPU) después de 7 días de cultivo	70
Tabla 6.4 Balance de carbono expresado en rendimientos de CO ₂ (Y _{CO₂/X}), biomasa (Y _{X/S}) y carbono soluble (Y _{TOC/S}) con respecto al carbono de BaP y extracto de levadura. Cultivos sólido (EPU) en ausencia y presencia de extracto de levadura, con 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ de BaP, después de 7 días de cultivo con <i>A. terreus</i>	74
Tabla 6.5 Producción de biomasa y carbono soluble por <i>A. terreus</i> en cultivo sólido (agrolita) con 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (50.0 mg g(soporte seco) ⁻¹) después 72 horas de cultivo	76
Tabla 6.6 Biodegradación de BaP y tasas de biodegradación por <i>A. terreus</i> en cultivo sólido (agrolita) con 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (50.0 mg (g soporte seco) ⁻¹) después de 72 horas de cultivo.....	80
Tabla 6.7 Balance de carbono en rendimientos de CO ₂ (Y _{CO₂/S}), biomasa (Y _{X/S}) y carbono soluble (Y _{TOC/S}) de la biodegradación de BaP por <i>A. terreus</i> es cultivo sólido (agrolita) con 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (50.0 mg (g soporte seco) ⁻¹ a 72 horas de cultivo.....	82

Tabla 6.8 Producción de biomasa y carbono soluble por <i>A. terreus</i> en cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL ⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (5.0 mg ml ⁻¹) a 72 horas de cultivo	85
Tabla 6.9 Biodegradación y tasas de biodegradación de 0.5 mg BaP mL ⁻¹ por <i>A. terreus</i> en cultivo líquido en ausencia y presencia de glucosa (5.0 mg mL ⁻¹) después de 72 horas de cultivo.....	88
Tabla 6.10 Balance de carbono en rendimiento de CO ₂ (Y _{CO₂/S}), biomasa (Y _{X/S}) y carbono soluble (Y _{TOC/S}) de la biodegradación de BaP por <i>A. terreus</i> es cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL ⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (5.0 mg mL ⁻¹) a 72 horas de cultivo	90
Tabla 6.11 Consumo del carbono soluble de los extractos acuosos por esporas frescas de <i>A. terreus</i>	92
Tabla 6.12 Rendimiento de la producción de biomasa por el consumo del carbono soluble (Y _{X/S}) la proporción de carbono total acumulado con respecto al carbono proveniente del BaP biodegradado	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura del tetraceno	4
Figura 1.2 Estructura del pireno	5
Figura 1.3 Estructura del A) trifenilo y B) criseno	5
Figura 1.4 Estructura del benzo(a)pireno	8
Figura 1.5 Rutas principales para de biodegradación aerobia de HAP por bacterias y hongos	28
Figura 1.6 Ruta de biodegradación de BaP por bacterias <i>M. vanbaanelii</i> PYR-1, <i>Mycobacterium</i> sp. RGJII-135 y <i>Beijernickia</i> sp. B-836	30
Figura 1.7 Ruptura del anillo aromático por enzimas ligninolíticas	32
Figura 1.8 Ruta de biodegradación de BaP por los hongos <i>C. elegans</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>P. janthinellum</i> y <i>A. terreus</i>	34
Figura 1.9 <i>Aspergillus terreus</i> A) morfología macroscópica B) morfología microscópica (Fotos obtenidas de Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS))	36
Figura 1.10 <i>Aspergillus terreus</i> A) morfología macroscópica B) morfología microscópica (Fotos obtenidas de Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS))	37
Figura 1.11 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> A) morfología macroscópica B) morfología microscópica (fotos obtenidas del Museo Nacional de Ciencia Natural y Joint Genome Istitute)	38
Figura 1.12 Estructura microscópica de: A) EPU y B) agrolita (fotografía tomada de Roulia y col., 2003)	40
Figura 6.1 Biodegradación de BaP por <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> y <i>P. chrysosporium</i> en cultivo sólido (EPU) con 0.5 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ después de 15 días de cultivo	62
Figura 6.2 Cinética de producción de biomasa (triángulos) y carbono soluble (círculos) generados durante la biodegradación de BaP por <i>A. terreus</i> en cultivo sólido (EPU) con 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ en ausencia de extracto de levadura	66
Figura 6.3 Cinética de producción de CO ₂ en cultivos con <i>A. terreus</i> en EPU; A) en presencia de 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ ; B) en ausencia de BaP	69
Figura 6.4 Cinética de biodegradación de 5.0 mg BaP (g soporte seco) ⁻¹ de por <i>A. terreus</i> en cultivo sólido (EPU) en ausencia de extracto de levadura	72
Figura 6.5 Cinética de producción de CO ₂ por <i>A. terreus</i> en cultivo sólido (agrolita) en ausencia de glucosa	78
Figura 6.6 Cinética de producción de CO ₂ por <i>A. terreus</i> en cultivo líquido en ausencia de glucosa	86
Figura 6.7 Reacción de reducción del WST-1 por acción de deshidrogenasa	97
Figura 6.8 Cinética de actividad deshidrogenasa de los extractos acuosos de cultivo sólido en agrolita (círculos negros) y cultivo líquido (círculos blancos)	98

Figura 6.9 Cinética de actividad deshidrogenasa de <i>A. terreus</i> en cultivo líquido con diferentes concentraciones iniciales de BaP	100
Figura 6.10 Tasas de actividad deshidrogenasa a diferentes concentraciones iniciales de BaP después de 64 horas de cultivo	101

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
A _w	Actividad de agua
BaP	Benzo(a)pireno, referencia a los cultivos con benzo(a)pireno como sustrato
BaP+Glu	Referencia a los cultivos con benzo(a)pireno y glucosa como sustratos
C/N	Relación carbono:nitrógeno
CG	Cromatografía de gases
CYA	Agar Czapek con extracto de levadura
DCM	Diclorometano
DD	Dihidrodiol deshidrogenasa
HAP	Hidrocarburo aromático policíclico
Lac	Lacasa
LiP	Lignin peroxidasa
MnP	Manganeso peroxidasa
PDA	Potato dextrose agar (Agar papa dextrosa)
EPU	Polyurethane foam (espuma de poliuretano)
QR	Coeficiente respiratorio
TR	Tiempo de retención

Acrónimos

USEPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos)
HMIS	Health Management Information System (Sistema de información del Manejo de la Salud)
NFPA	National Fire Protection Association (Asociación Nacional de Protección del Fuego)

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium* para biodegradar altas concentraciones de benzo(a)pireno (BaP) en cultivo sólido, con espuma de poliuretano (EPU) como soporte. Los tres hongos filamentosos estudiados fueron capaces de biodegradar 0.5 mg BaP (g soporte seco)⁻¹. La presencia de la glucosa en el medio de cultivo tuvo un efecto diferente para cada hongo; en *A. terreus* se observó el máximo nivel de biodegradación en ausencia de glucosa, seguido por *P. chrysosporium*, el cual biodegradó el mismo nivel de BaP en ausencia y en presencia de glucosa y finalmente, *A. niger*, el cual presentó el máximo nivel de biodegradación en presencia de glucosa. En el intervalo estudiado y en ausencia de glucosa, la relación C/N influyó en la biodegradación de BaP de manera independiente para los microorganismos, obteniéndose la mayor biodegradación a C/N de 5 y 15 para *A. terreus*.

Durante los cultivos se consideró la remoción de BaP como criterio para seleccionar la cepa con la mayor capacidad de biodegradación. Los estudios de biodegradación se continuaron con *A. terreus* como modelo de trabajo. Se evaluó la biodegradación de 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en cultivo sólido con EPU, encontrándose que bajo las concentraciones estudiadas, la presencia de extracto de levadura en el medio de cultivo, no modificó los niveles de biodegradación de BaP por *A. terreus*, de manera similar, se encontró que la concentración inicial de BaP no influyó en el nivel de biodegradación.

La EPU aportó compuestos carbonados que favorecieron la biodegradación de BaP, por lo que no fue posible estudiar la biodegradación de BaP como única fuente de carbono por *A. terreus*, por esto se continuaron los ensayos en cultivo sólido con agrolita como soporte. La biodegradación de 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ como única fuente de carbono fue significativamente menor a la encontrada en el cultivo con EPU. La presencia de glucosa no favoreció la biodegradación de BaP.

Se realizaron ensayos de biodegradación con *A. terreus* en cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa. La biodegradación en este sistema en ausencia de glucosa, fue menor al encontrado para el cultivo sólido con agrolita, en el caso de los cultivos con glucosa, la presencia del azúcar incrementó la biodegradación, al contrario de los cultivos sólidos.

Al final de la biodegradación de BaP como única fuente de carbono, a diferencia del cultivo sólido con EPU, en cultivo sólido con agrolita y cultivo líquido, se obtuvieron balances con altos niveles de recuperación de carbono, encontrándose para el cultivo sólido con agrolita y el cultivo líquido niveles bajos de producción de CO₂ y biomasa.

La mayor proporción del carbono inicial se encontró en forma soluble (metabolitos hidrosolubles), en esta fracción hubo compuestos que inhibieron la biodegradación del BaP. La subsiguiente biodegradación de los metabolitos hidrosolubles produjo altos rendimientos de biomasa, debido al mayor nivel de oxidación de las moléculas con respecto al BaP. Con estos experimentos se demostró que para el BaP, la acumulación de ciertos compuestos inhiben la biodegradación total de los metabolitos hidrosolubles.

Finalmente, se realizaron estudios sobre actividad deshidrogenasa de *A. terreus* en cultivo líquido en presencia de diversas concentraciones de BaP, encontrándose la máxima actividad entre 0.05 y 0.12 mg BaP mL⁻¹. Sin embargo, también a las mayores concentraciones estudiadas (2.5 y 5.0 mg mL⁻¹) se presentó actividad deshidrogenasa, con lo que se demostró que a altas concentraciones en cultivo líquido, la actividad metabólica de *A. terreus* para biodegradar BaP no fue inhibida.

A. terreus fue capaz de biodegradar altas concentraciones de BaP como única fuente de carbono y energía, en cultivo sólido y en cultivo líquido. La agrolita como soporte en cultivo sólido, permitió el análisis de la distribución del carbono procedente del BaP biodegradado.

ABSTRACT

In the present work was evaluated the capacity of *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporium* to biodegrade high concentrations of benzo(a)pyrene (BaP) in solid culture on polyurethane foam as matrix. The three filamentous fungi studied were able to biodegrade 0.5 mg BaP (g dry matrix)⁻¹. The presence of glucose in the culture media provoked different effects in each fungus, *A. terreus* showed the maximum biodegradation level in the absence of glucose, followed by *P. chrysosporium* which biodegraded the same level of BaP in absence as in presence of glucose and finally, *Aspergillus niger* showed the maximum biodegradation level in presence of glucose. In the absence of glucose and in the studied range, the C/N ratio influences the biodegradation of BaP in an independent way for the microorganisms used, the C/N ratio influences only the BaP biodegradation by *A. terreus*, showing the highest levels when C/N was 5 and 15. During cultures the removal of the BaP was considered as a standard to select the strain with the highest capacity of biodegradation. The studies of biodegradation continued with of *A. terreus* as a model of study. It was evaluated the effect of the yeast extract over the biodegradation of 0.5 y 5.0 mg BaP (g dry matrix)⁻¹ was evaluated in a solid culture with polyurethane foam (PUF), finding that under the studied concentrations, the presence of yeast extract in the culture media did not modify the BaP biodegradation levels by *A. terreus*, in a similar way, it was found that the initial concentration of BaP had not effect upon the biodegradation extent. The PUF contained impurities (carbon compounds) that enhance the biodegradation of 0.5 and 5.0 mg BaP (g dry matrix)⁻¹, because of this, the assays were performed on perlite as solid inert support. The biodegradation of 5.0 mg BaP (g dry matrix)⁻¹ as sole source of carbon was significantly lower than the one founded in cultures with polyurethane foam. The presence of glucose did not enhance the biodegradation. Assays of biodegradation of 0.5 mg BaP mL⁻¹ in liquid culture in absence and presence of glucose were made. The biodegradation in absence of glucose was

lower to the one founded in solid cultures with perlite, in case of liquid cultures with glucose the biodegradation was increased.

At the end of the biodegradation of the BaP as sole source of carbon, unlike solid cultures on PUF, in solid cultures on perlite and in liquid culture, carbon balances with high levels of recovery carbon were observed. In both cultures poor levels of CO₂ and biomass were found.

The highest proportion of carbon was founded as soluble carbon (hydrosoluble metabolites), in this fraction compounds that probably inhibited the biodegradation of BaP were found. The subsequent biodegradation of the hydrosoluble metabolites resulted in a high biomass production due to the higher oxidation level of the soluble molecules with respect to the BaP oxidation level. Within this experiments, the accumulation of certain compounds that inhibited the total biodegradation of the soluble metabolites, was demonstrated.

Finally, studies related to the dehydrogenase activity of *A. terreus* in liquid culture in the presence of different concentrations of BaP were performed. The maximum enzymatic activity was found between 0.05 and 0.12 mg BaP mL⁻¹, and also at the higher concentrations studied (2.5 y 5.0 mg mL⁻¹) the dehydrogenase activity was present.

In summary, *A. terreus* was capable to biodegrade high concentrations of BaP as sole source of carbon and energy, in both, liquid culture and solid culture. Perlite, as inert support matrix in solid culture allowed the analysis of the final distribution of the carbon from the BaP.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son compuestos orgánicos formados por dos o mas anillos bencénicos. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, y son originados a partir de la combustión incompleta de materia orgánica por dos fuentes principales: natural y antropogénica. La persistencia de los HAP en el ambiente depende de un gran número de factores físicos, químicos, biológicos y ambientales (Bamforth y Singleton, 2005).

Muchas especies de bacterias y hongos biodegradan HAP en cultivo líquido (Juhász y Naidu, 2000) y hay un gran interés por utilizar estos microorganismos para la eliminación de estos compuestos de sitios contaminados. Los HAP de bajo peso molecular son mineralizados por bacterias, los de alto peso molecular como el benzo(a)pireno (BaP), son difícilmente biodegradados por bacterias, debido a su baja solubilidad en agua y a que regularmente se unen a las partículas del suelo disminuyendo su biodisponibilidad (Cerniglia, 1993; Kotterman y col., 1998). Por su estrategia nutrimental, los hongos son ampliamente utilizados para biodegradar BaP en suelos contaminados (Sutherland, 1992).

Aislado e identificado por primera vez en 1931 y frecuentemente encontrado en suelos, el BaP es persistente y carcinógeno (Phillips, 1983). Se ha convertido en el compuesto de interés en muchos estudios de biodegradación con hongos filamentosos (Cerniglia y Gibson, 1979; Datta y Samanta, 1988, Steffen y col., 2002; Capotorti y col., 2004). La mayoría de los estudios se han desarrollado con hongos ligninolíticos (Boyle y col., 1998; Martens y Zadrazil, 1998; Tekere y col., 2005), en particular el hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* se ha convertido en un modelo de estudio para la biodegradación de BaP y otros HAP (Barclay y col., 1995; Liao y col., 1997; Zheng y Obbard, 2002; Dzul-Puc y col., 2005). Los estudios de biodegradación con hongos no ligninolíticos, se han desarrollado principalmente con *Cunninghamella elegans* (Cerniglia y Gibson, 1979; Pothuluri y col., 1996), en los últimos años se ha comenzado a realizar investigación

con otros géneros como *Penicillium* (Launen y col., 1995, Launen y col., 2000; April y col., 2000; Amezcua-Allieri y col., 2003), *Fusarium* (Romero y col., 2002; Veignie y col., 2002; Verdin y col., 2004) y *Aspergillus* (April y col., 2000; Ravelet y col., 2000; da Silva y col., 2003; Capotorti y col., 2004).

En general, los estudios de biodegradación con hongos se han realizado en su mayoría en cultivo líquido, aun y cuando es bien sabido que los hongos filamentosos están bien adaptados para crecer en ambientes terrestres, haciéndolos atractivos para la biorremediación de suelos.

Por lo anterior, resulta interesante estudiar la biodegradación de BaP por hongos filamentosos en sistemas sólidos modelo, con el objetivo de estudiar los procesos microbianos en condiciones controladas. El presente trabajo propone la utilización de espuma de poliuretano (EPU) y agrolita como soportes, para el estudio de la biodegradación de altas concentraciones de BaP en cultivos sólidos por hongos filamentosos. Por otro lado, comparar la biodegradación de altas concentraciones de BaP en medio líquido.

El estudio se dividió en cuatro etapas:

1. Se estudió la capacidad de biodegradación de $0.5 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$, en cultivo sólido con EPU en presencia y ausencia de glucosa, de tres hongos filamentosos: *Aspegillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium*. Se evaluó el efecto de la relación carbono nitrógeno (C/N) del medio de cultivo sobre la biodegradación de BaP en ausencia de glucosa.

2. Se evaluó la biodegradación de 0.5 y $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ por *A. terreus* en presencia y ausencia de extracto de levadura en cultivo sólido con EPU en ausencia de glucosa y con una relación C/N de 15.

Se estudió la capacidad de *A. terreus* para biodegradar $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ como única fuente de carbono y energía en cultivo sólido con agrolita, así como la biodegradación de BaP en presencia de glucosa. Estos ensayos se llevaron a cabo con una relación C/N de 15 y en ausencia de extracto de levadura. La evaluación de la biodegradación se realizó cuantificando el consumo de BaP y la producción de biomasa, CO_2 y carbono soluble (compuestos hidrosolubles).

3. Se analizó la biodegradación de $0.5 \text{ mg BaP mL}^{-1}$ como única fuente de carbono y energía por *A. terreus* en cultivo líquido. Se evaluó la biodegradación de BaP en presencia de glucosa como sustrato alternativo. Los cultivos se llevaron a cabo en ausencia de extracto de levadura, con una relación C/N de 15. Se cuantificó la remoción de BaP y la producción de biomasa, CO_2 y carbono soluble.

Se estudió la biodegradación por *A. terreus* de los compuestos hidrosolubles obtenidos de los ensayos de biodegradación de BaP en ausencia de glucosa, en cultivo sólido con agrolita y en cultivo líquido. En estos ensayos se cuantificó la remoción de los compuestos hidrosolubles y la producción de biomasa.

4. Se evaluó la actividad deshidrogenasa de *A. terreus* en presencia de BaP como única fuente de carbono y energía, en un amplio intervalo de concentraciones, de 1×10^{-3} hasta $5.0 \text{ mg BaP mL}^{-1}$. También se determinó la actividad deshidrogenasa de *A. terreus* utilizando los compuestos hidrosolubles como sustrato.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son una clase de compuestos tóxicos, producto de la pirólisis incompleta de materia orgánica. Están presentes en concentraciones considerables en combustibles fósiles y se acumulan en el ambiente debido a una gran variedad de actividades antropogénicas. El mecanismo de formación de los HAP durante la combustión incompleta se da por dos reacciones distintas, la pirólisis y la pirosíntesis. Con altas temperaturas, los compuestos orgánicos son parcialmente fraccionados en pequeñas moléculas inestables (pirólisis) liberándose energía. Estos fragmentos, principalmente como radicales libres, se recombinan para producir HAP de mayor tamaño (Lee y col., 1981). Sin embargo, las altas temperaturas no son necesarias para la aromatización de la materia orgánica. Por ejemplo, los hidrocarburos aromáticos del crudo, se formaron durante millones de años en sedimentos a temperaturas entre 100 y 150°C.

Los HAP pertenecen a una clase de compuestos que consisten en anillos aromáticos fusionados en configuraciones estructurales variadas. De acuerdo con Zander (1983), el grupo de HAP puede ser dividido en dos subgrupos:

- a) Sistemas catacondensados, en donde los átomos de carbono terciarios se encuentran en el centro de dos anillos adyacentes, como por ejemplo en el caso del tetraceno (Figura 1.1).

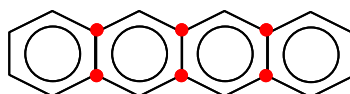


Figura 1.1 Estructura del tetraceno

- b) Sistemas pericondensados, donde alguno de los átomos de carbono terciario están en el centro de tres anillos adyacentes, como es el caso del pireno (Figura 1.2).

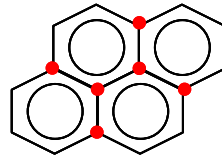


Figura 1.2 Estructura del pireno

Por otro lado, los anillos pueden estar alineados en el mismo plano, como en el caso del tetraceno, o angulares cuando los anillos se encuentran en diferentes planos horizontales, con un ángulo entre planos de 120° . El trifenileno y el criseno son ejemplos de HAP con anillos alineados y angulares (Figura 1.3).

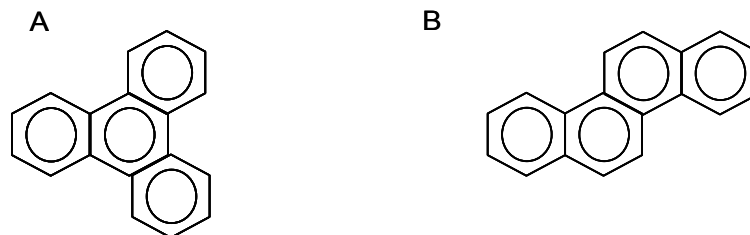


Figura 1.3 Estructura del A) trifenileno y B) criseno

Las fuentes de los HAP ambientales incluyen sistemas de calefacción de aceite o madera, motores de gasolina o diesel, incineración de desperdicios, diversas actividades industriales, humo del tabaco, alimentos ahumados o asados al carbón, incendios forestales, entre otros (Samanta y col., 2002). Más específicamente, los procesos de refinación del petróleo, han producido descargas de estos hidrocarburos al ambiente a través de los efluentes industriales de gasificación del carbón y sus procesos de licuefacción y por los derrames accidentales del petróleo crudo y refinado. Los HAP, además de encontrarse en la atmósfera, están presentes en la vegetación, suelo, agua y sedimentos. Wagrowski y Hites (1997) reportaron que la carga de HAP totales en la vegetación rural es, en promedio, un décimo del

encontrado en las muestras urbanas, confirmando que las cargas atmosféricas de éstos son mayores en las cercanías de los lugares de su producción.

Los HAP son altamente liposolubles por lo que son absorbidos en el tracto gastrointestinal de los mamíferos y distribuidos rápidamente a una amplia variedad de tejidos, principalmente se localizan en la grasa corporal (Mastrangelo y col., 1996; Goldman y col., 2001). Muchos HAP son considerados como contaminantes ambientales que tienen un efecto negativo en la flora y fauna de los ecosistemas afectados, resultando la acumulación de químicos tóxicos en las cadenas alimenticias, en algunos casos, en serios problemas de salud y/o en defectos genéticos en humanos. Como consecuencia de esto, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) ha listado a 16 HAP como contaminantes prioritarios para remediación, en la cual se incluye al BaP (Samanta y col., 2002). En la Tabla 1.1 se presentan las propiedades fisicoquímicas de 15 HAP listados por la USEPA.

Los HAP son compuestos hidrofóbicos y su persistencia en el ambiente de debe principalmente a sus propiedades fisicoquímicas, como su baja solubilidad en agua, baja volatilidad, baja presión de vapor y resistencia a las reacciones químicas. Los HAP de alto peso molecular presentan una mayor persistencia en el ambiente que los de bajo peso molecular, debido al incremento de la hidrofobicidad y la estabilización por resonancia al incrementarse la masa. En general, las propiedades lipofílicas, la persistencia ambiental y la genotoxicidad de los HAP se incrementa al aumentar el tamaño molecular a más de 4 o 5 anillos bencénicos (Cerniglia, 1992). La relación entre la persistencia ambiental y el incremento en el número de anillos es consistente con los resultados de estudios que correlacionan las tasas de biodegradación y el peso molecular de los HAP (Boonchan y col., 2000; Joner y col., 2002; Pannu y col., 2003).

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de los HAP contenidos en la norma de la EPA

<i>Compuesto</i>	<i>PM^a</i>	<i>No. anillos</i>	<i>Pe^b (°C)</i>	<i>Sol (mg/L)</i>	<i>Log K_{ow}^c</i>
Naftaleno	128	2	218.0	31.40	3.33
Acenaftileno	152	3	270.0	3.930	3.93
Acenafteno	154	3	279.0	4.240	4.15
Fluoreno	166	3	298.0		4.18
Antraceno	178	3	340.0	0.043	4.54
Fenantreno	178	3	338.0	1.290	4.55
Flouranteno	202	4	384.0	0.260	4.93
Pireno	202	4	393.0	0.140	5.14
Benzo(a)antraceno ^d	228	4	435.0	0.014	5.91
Criseno	228	4	431.0	2 x 10 ⁻³	5.84
Benzo(b)fluoranteno ^d	252	5		1.5 x 10 ⁻³	6.11
Benzo(k)fluoranteno ^d	252	5	480.0	5.5 x 10 ⁻⁴	6.10
Dibenzo(a,h)antraceno ^d	278	5	535.0	5 x 10 ⁻⁴	6.75
Benzo(ghi)perileno	276	6	500.0	2.6 x 10 ⁻⁴	6.11
Indeno(1,2,3-c,d)pireno ^d		6	536.0	0.062	7.66

Tabla adaptada de Juhasz y Naidu, 2000 y Ferreira, 2001

^a Peso molecular

^b Punto de ebullición

^c Coeficiente de partición octanol:agua

^d HAP de la Norma Oficial Mexicana NOM-138 SEMARNAT/SS-2003

Desde los años 70, investigaciones sobre los efectos biológicos de los HAP han demostrado que bacterias, hongos y algas poseen habilidades catabólicas utilizables en la biorremediación de suelo y agua. En el presente, se ha demostrado que la biorremediación es efectiva en la remediación de suelos contaminados con HAP de bajo peso molecular (Kastner y Mahro, 1996); sin embargo, los HAP de alto peso molecular son recalcitrantes al ataque microbiano (Cerniglia, 1992). Aunque la falta de actividad microbiana ante los HAP de alto peso molecular puede ser atribuida a los factores ambientales específicos del sitio, como la biodisponibilidad del contaminante, nutrientes, potencial redox, entre otros, el factor limitante puede ser la

carencia de microorganismos capaces de degradar los compuestos altamente condensados. Para que la biorremediación sea una herramienta efectiva para la limpieza de suelos contaminados con HAP, se requiere un mayor conocimiento de los procesos involucrados y sobretodo de aquellas etapas que limitan la degradación de HAP de alto peso molecular como el BaP, en la naturaleza (Juhasz y Naidu, 2000).

1.2 Benzo(a)pireno

El BaP ha sido clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) y la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación) como contaminante prioritario, debido a sus características tóxicas y a que su presencia en el ambiente es preocupante.

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas

El BaP está constituido de 5 anillos de arreglo pericondensado, en la Figura 1.4 se presenta la estructura del BaP.

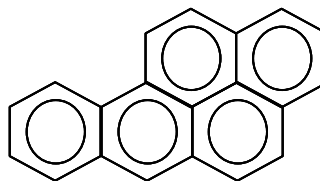


Figura 1.4 Estructura del benzo(a)pireno

El BaP es un polvo amarillo inodoro, tiene baja solubilidad en agua y presión de vapor y un alto coeficiente de partición octanol:agua, lo que le confiere una alta solubilidad en fases no acuosas. En la Tabla 1.2 se presentan las propiedades fisicoquímicas del BaP.

Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas del BaP

<i>Propiedad</i>	<i>Valor</i>
Peso molecular	252
No. Anillos	5
Punto de ebullición (°C)	496.0
Punto de fusión (°C)	179
Solubilidad en agua (mg/L)	0.0038
Presión de vapor (torr a 20°C)	5.0×10^{-7}
Log K_{OW}^a	6.3
Log K_{OA}^b	10.71
Log K_{OC}^c	6.46
Log K_{AW}^d	-3.6

Tabla adaptada de Juhasz y Naidu, 2000 y Ferreira, 2001

^a Coeficiente de partición octanol:agua

^b Coeficiente de partición octanol:aire

^c Coeficiente de partición de carbon orgánico

^d Coeficiente de partición aire:agua

1.2.2 Producción y presencia en el ambiente

El BaP, al igual que el resto de los HAP, es producido por la combustión incompleta de materia orgánica, ya sea de manera natural como los procesos geológicos y los incendios forestales o por medio de actividad humana, particularmente durante la utilización de combustibles, procesos pirolíticos, derrames de productos de petróleo, utilización de sistemas de calefacción e incineradores, entre otros. En países industriales, la combustión por actividades antropogénicas es la mayor fuente de producción de BaP.

El BaP ha sido encontrado en una amplia variedad de muestras ambientales, incluyendo aire, suelo, agua, sedimentos, aceites, plantas y alimentos.

1.2.2.1 BaP en la atmósfera

La mayor ruta de transporte del BaP es a través de la atmósfera. Resultados de programas de monitoreo de aire han demostrado concentraciones de BaP del orden de ng/m^3 . Sin embargo, la concentración de este compuesto varía según la época del año, dependiendo de las actividades humanas (Tabla 1.3). Halsall y col. (1997), observaron una distribución estacional de las concentraciones de BaP en la atmósfera ártica, encontrando las mayores concentraciones en los meses de invierno los cuales coinciden con el periodo de niebla ártica. Sin embargo, las concentraciones de BaP en la atmósfera de zonas industriales son de varias ordenes de magnitud mayor, que las observadas en la atmósfera de zonas con ausencia de fuentes fijas de contaminación.

Tabla 1.3 Concentración de BaP detectado en varias muestras atmosféricas

Sitio	Concentración de BaP (ng m^{-3})	
	Verano	Invierno
Thessaloniki, Grecia ^a	2.1×10^{-3}	2.4×10^{-3}
Esthwaite, RU ^b	0.510	8.060
Castleshaw, RU ^b	0.130	3.140
Alert, Isla Ellesmere ^c	0.007	0.002
Dunai Island, Este de Siberia ^c	0.026	0.001

^a Kipopoulou y col., 1999

^b Gardener y col., 1995

^c Halsall y col., 1997

Los vehículos de motor, incluyendo automóviles, camiones y autobuses de gasolina y diesel, también contribuyen a la contaminación atmosférica de HAP. Durante la combustión del diesel se produce una mayor cantidad de HAP de bajo peso molecular, mientras que la combustión de gasolina produce predominantemente HAP de alto peso molecular incluyendo al BaP. Harkov y col. (1984), reportaron que el

98% del BaP emitido a la atmósfera en el estado de New Jersey, provenía de los automóviles.

Los incendios forestales y en praderas, así como cualquier sistema de calefacción casera con combustión de madera, genera grandes cantidades de BaP. Se han determinado $60 \mu\text{g m}^{-3}$ de BaP en emisiones de pequeñas estufas caseras (Freeman y Cattell, 1990). El humo de las fogatas puede contener hasta 70 mg BaP m^{-3} , lo cual es aproximadamente 350 veces la cantidad encontrada en el humo del cigarro (Gamlin y Price, 1988). En general, la cantidad de BaP residual por la combustión de madera u otro tipo de vegetación varía dependiendo del material; por ejemplo, Freeman y Cattell (1990), encontraron concentraciones de $194 \text{ mg BaP Kg}^{-1}$ en muestras de matorrales incinerados nativos de Australia; en contraste encontraron $71 \text{ mg BaP Kg}^{-1}$ de una combinación de matorrales autóctonos y especies introducidas y $2.2 \text{ mg BaP Kg}^{-1}$ de muestras de papel incinerado.

1.2.2.2 BaP en suelos

Los suelos son importantes depósitos a largo plazo de BaP y éste es considerado como el indicador estacionario del estado de contaminación ambiental. Generalmente, las concentraciones de BaP en suelos se incrementan con el aumento las actividades industriales, el tráfico y la calefacción doméstica, en el siguiente orden: suelos de arado < suelos minerales bajo bosques < pastizales permanentes < suelos urbanos < sitios contaminados (Wilcke, 2000).

El BaP llega al suelo por deposición de la atmósfera y el flujo en suelo está influenciado por la concentración atmosférica. Generalmente, las concentraciones del BaP en el suelo decrecen exponencialmente al incrementarse la distancia desde el punto de contaminación (Wilke y col., 1999). La sorción y desorción son procesos cruciales para la biodisponibilidad y el transporte del BaP. La materia orgánica contenida de manera natural en los suelos es el sorbente mas importante de esta molécula (Haitzer, y col., 1999).

La acumulación de HAP en los suelos puede generar contaminación potencial de vegetales y cadenas alimenticias, y entonces causar exposición directa o indirecta a los seres humanos. Por lo tanto, el conocimiento de la contaminación de suelos con BaP es necesaria para eliminar cualquier riesgo de producción de alimentos y restringir el daño por el efecto de este compuesto (Wilson y Jones, 1993).

En la Tabla 1.4 se encuentran algunos reportes sobre la presencia de BaP en suelos en varios países.

Tabla 1.4 Concentración de BaP en suelos

<i>Fuente</i>	<i>Uso de suelo</i>	<i>BaP ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	<i>Referencia</i>
Chiang Mai, Tailandia	Rural	0.224	Amagai y col., 1999
Beijín, China	Rural / Urbano	0.005, 0.270	Ma y col., 2005
Monchegorsk, Rusia	Cercano a aeropuerto	4 – 197	Barcan y col., 2000
Cambridgeshire, RU	Después de un incendio	1.2	Meharg y col., 1998
Salamanca, México	Industrial	78	UAM, 2005
Thessaloniki, Grecia	Agrícola rodeado de industria	2.4	Kipopoulou y col., 1999
Bangkok, Tailandia	Urbano	5.5	Wilcke y col., 1999

1.2.2.3 BaP en plantas

El BaP se puede acumular también en la vegetación, lo cual puede provocar una exposición indirecta a los humanos a través de los alimentos (Wagrowski y Hites, 1997). Existen diversos estudios sobre la acumulación de BaP en las plantas; la deposición gaseosa (atmosférica) es la principal vía de dicha acumulación en vegetales y las emisiones a partir de la combustión de aceites fósiles, han demostrado tener una fuerte influencia en los niveles y perfiles de acumulación en las plantas (Kipopoulou y col., 1999), generando una retención del BaP en la cera de la cutícula de las hojas (Trapp y col., 1990). En algunos casos, se ha visto una relación directa entre las concentraciones de BaP del suelo y las plantas, sugiriendo una

posible ruta del suelo contaminado a las raíces (Staci y col., 1994). Las condiciones en la interfase suelo-raíz, referida como rizósfera, son considerablemente diferentes a las existentes en el suelo a cierta distancia de las raíces (Liste y Alexander, 2000), por lo tanto, el cambio del BaP en la rizósfera es uno de los factores claves asociados con la sorción y acumulación de este HAP en la planta (Tao y col., 2004). Un gran número de factores pueden influir en la acumulación del BaP en las plantas, como las especie y estructuras de las plantas (Wagrowski y Hites, 1997), así como las condiciones ambientales, incluyendo la concentración en el ambiente, temperatura y condiciones de viento. En la Tabla 1.5 se presenta la concentración de BaP encontrada en algunas plantas comestibles.

Tabla 1.5 BaP en tejidos de plantas comestibles

<i>Planta</i>	<i>BaP ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)</i>	<i>Referencia</i>
Col	1.00	Kipopoulou y col., 1999
Endivia	0.10 – 0.48	Kipopoulou y col., 1999
Lechuga	0.08 – 0.74	Kipopoulou y col., 1999
Moras		
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	0.60 – 3.00	Barcan y col., 2000
<i>Vaccinium myrtilus</i>	4.00	Barcan y col., 2000
<i>Empetrum nigrum</i>	0.60 – 1.40	Barcan y col., 2000
<i>Rubus chamaemorus</i>	1.40	Barcan y col., 2000
Poro	0.08 – 0.50	Kipopoulou y col., 1999
Zanahoria	0.09 – 0.22	Kipopoulou y col., 1999

1.2.2.4 BaP en sedimentos

Como el BaP tiene una baja solubilidad en agua y un alto coeficiente de partición octanol:agua, su concentración en agua es extremadamente baja. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrófoba se acumula en las partículas de carbón orgánico de

los sedimentos (Meador y col., 1995). En la Tabla 1.6 se presentan las concentraciones de BaP encontradas en muestras de sedimentos.

Tabla 1.6 Concentraciones de BaP en sedimentos

<i>Sitio</i>	<i>BaP (mg Kg⁻¹)</i>	<i>Referencia</i>
Malburger Haven, Países Bajos ^a	39	Huis in't Veld y col., 1995
Rijas Binneneheven, Países Bajos ^a	78	Huis in't Veld y col., 1995
Delta del Rhin-Muese ^b	5.2	Hendrix y col., 1998
Kitimat Arm, CB, Canadá ^c	0.135 – 1100	Paine y col., 1996
Kildala Arm, CB, Canadá ^c	0.02	Paine y col., 1996

Por lo tanto, los sedimentos pueden ser considerados como reservorios de BaP, que son acumulados debido a varios procesos como la deposición atmosférica, escurrimientos marinos de hidrocarburos de petróleo, extracción y transporte de petróleo en mar abierto, vertederos de aguas contaminadas en el mar y actividades con transportes marítimos, entre otros (Juhazs y Naidu, 2000).

1.2.2.5 BaP en organismos marinos

Además de acumularse en partículas microscópicas en el aire, sedimentos, suelos y plantas, el BaP puede encontrarse en organismos marinos (Tabla 1.7). La acumulación de BaP depende de su biodisponibilidad (por ejemplo su distribución entre los sedimentos, agua y alimentos), así como de la fisiología del organismo (Meador y col., 1995).

El tamaño del organismo, la tasa de alimentación y crecimiento, la permeabilidad de la membrana, la tasa de respiración, el tiempo de residencia del alimento en el intestino y la osmoregulación son procesos biológicos que influyen en su acumulación. Los factores ambientales, como la temperatura, la concentración de oxígeno, el pH y la salinidad también pueden influir en la acumulación del BaP en los

organismos marinos. Además los cambios en el comportamiento del organismo, los ritmos estacionales, la calidad nutricional y el estrés también pueden influir en la asimilación del BaP.

Tabla 1.7 Concentraciones de BaP en organismos marinos

<i>Organismo</i>	<i>Fuente</i>	<i>BaP (ng g⁻¹)</i>	<i>Referencia</i>
Pescados			
<i>Pseudopleuronectes americanus</i> ^a	NY Bight	7 – 21 ^d	Humason y Gadbois (1982)
<i>Scophthalmus aquosus</i> ^a	NY Bight	1 – 4 ^d	Humason y Gadbois (1982)
Moluscos			
<i>Mytilus edulis</i> ^{b +conch}	Cornwall, RU	0.42 – 0.81 ^e	Durand y col. (2002)
Mejillones ^b	Italia	0.24 – 75.2 ^d	Valerio y col. (2000)
<i>Cardium edule</i> ^b	Italia	5 – 21 ^d	Cocchieri y col. (1990)
Crustaceos			
<i>Cancer irroratus</i> ^a	NY Bight	≤ 1 ^d	Humason y Gadbois (1982)
<i>Homarus americanus</i> ^c	Nueva Escocia	0.4 – 1000 ^d	Sirota y col. (1993)
Diatomeas			
<i>Navicula phyllepta</i> ^b	Países Bajos	25 ^e	Strongkhost y col. (1994)
Algas			
<i>Fucus vesiculosus</i>	Mar Báltico	5 – 9 ^e	Kirso e Irha (1998)
<i>Chara aspera</i>	Mar Báltico	2.5 – 5.5 ^e	Kirso e Irha (1998)

^a Concentraciones determinadas en tejidos comestibles

^b Todo el organismo menos la concha

^c Todo el organismo menos el hepatopáncreas

^d Concentraciones determinadas por peso húmedo

^e Concentraciones determinadas por peso seco

El BaP puede ser eliminado de los organismos por difusión pasiva o por la excreción de los metabolitos polares producidos a partir de su oxidación parcial en el metabolismo. De nuevo, la tasa de eliminación será dependiente de los factores ambientales y fisiológicos.

1.2.3 Toxicidad

Desde hace mucho tiempo se conoce que los HAP afectan seriamente la salud humana, el médico John Hill reconoció por primera vez la relación entre la utilización del tabaco en polvo (rapé) y el cáncer nasal (Bamforth y Singleton, 2005). Seguido a este descubrimiento, ha continuado la investigación sobre los efectos tóxicos de varios HAP en la salud de los mamíferos, mostrando sus propiedades carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas.

Cuando son ingeridos, los HAP son absorbidos rápidamente en el tracto gastrointestinal debido a su alta solubilidad en lípidos. La mayor ruta de absorción es por vía dérmica, como lo señala un estudio con trabajadores en hornos de coque (Vanrooij y col., 1993). Se ha estimado que el 75% del total de HAP absorbidos entra al cuerpo a través de la piel, señalando que es la ruta de exposición mas generalizada.

La toxicidad relativa de los HAP puede ser medida utilizando los valores de la dosis letal 50 (DL₅₀), expresados en mg del material tóxico por Kg del peso corporal del sujeto que producirá la muerte en el 50% de los individuos. Es importante, en este caso, señalar la vía de administración del material tóxico al animal de prueba (como oral o peritoneal), así como la clase de animal utilizado (ratón, rata, etc).

El BaP es uno de los HAP mas carcinógenos y por lo tanto, es el más estudiado. Se ha demostrado que el BaP es un compuesto carcinógeno, ya que produce tumores en animales experimentales al administrarlo por vía oral, cutánea, inhalación y/o administración intratraqueal, subcutanea y/o intramuscular, intraperitoneal, implantación intrabronquial y vía intraplacental (Collins y col., 1991) (Tabla 1.8).

Los HAP son carcinógenos pero no son genotóxicos sino hasta ser “activados” enzimáticamente a epóxidos y quinonas reactivas. Esto ocurre por las enzimas que oxidan los anillos aromáticos hasta intermediarios reactivos. Se ha reportado que estos intermediarios pueden sufrir uno de por lo menos cuatro mecanismos diferentes de oxidación y/o hidrólisis antes de que se combinen y/o ataquen al ADN

para formar aductos covalentes. Los aductos del ADN pueden producir mutaciones, que generan tumores.

Tabla 1.8 Efecto de la administración de BaP en animales experimentales

<i>Forma de administración</i>	<i>Efecto</i>	<i>Animal probado</i>
Dieta	Tumores en el estómago y adenomas pulmonares	Ratones
Inhalación tópica	Carcinoma de piel y papilomas	Ratones, ratas, cobayos, ratones
	Papilomas traqueales y carcinomas	Hamsters
Implantación intratraqueal	Tumores en pulmones	Ratas
	Tumores traqueobronquiales	Hamsters, primates
Inyección subcutánea	Sarcomas locales, hepatomas y adenomas pulmonares	Ratones, ratas, cobayos, tritones, hamsters, primates
Inyección intraperitoneal	Fibrosarcomas abdominales	Ratones
	Carcinomas mamarios y uterinos	Ratas
Inyección intravenosa	Carcinomas mamarios	Ratas
Implantación intrabronquial	Tumores locales	Ratas

Tabla adaptada de Juhasz y Naidu, 2000

En estudios con cultivos de células de mamífero, se ha observado que el BaP puede inducir unión de ADN, intercambio de cromátida, aberraciones cromosomales y anomalía espermática entre otros (Serres y Sabih, 1981).

Hasta el momento, no existen estudios epidemiológicos para la observación del potencial carcinógeno del BaP en seres humanos; sin embargo, los datos obtenidos de los estudios en animales han sido extrapolados para estimar el riesgo de cáncer.

En el Apéndice 1 se presenta la hoja de datos de seguridad del BaP.

1.3 Biodegradación de benzo(a)pireno

La persistencia de los HAP en el ambiente depende de sus características físicas y químicas; éstos son degradados por oxidación fotolítica y química (Shiaris, 1989), pero la transformación biológica es probablemente la ruta de desaparición de los HAP que prevalece (Mueller y col, 1990). La resistencia de los HAP al ataque microbiano aumenta directamente con el peso molecular y el coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{OW}$) (Cerniglia, 1992).

La oxidación microbiana inicial de los hidrocarburos aromáticos consiste en la incorporación enzimática de oxígeno atmosférico al sustrato. Generalmente, las bacterias producen dioxigenasas, que incorporan dos átomos de oxígeno en el núcleo aromático, mientras que los hongos producen monooxigenasas que incorporan un solo átomo de oxígeno. La oxidación inicial del anillo, es usualmente la etapa limitante de las reacciones de degradación de los HAP (Cerniglia, 1992).

Una vez que el anillo que ha sido hidroxilado se ha degradado, un segundo anillo es atacado de forma similar al anterior (Atlas y Bartha, 2002). Sin embargo, muchos de los HAP de alto peso molecular, como el BaP, pueden no ser degradados y si lo son, por lo general son oxidados parcialmente, esto es debido a su baja solubilidad en agua y alta energía de resonancia (Cerniglia, 1992).

1.3.1 Biodegradabilidad

Así como en el ambiente, los sistemas de estudio en laboratorio tienen parámetros que pueden afectar el nivel de biodegradación de los HAP. La biodegradabilidad de una sustancia depende principalmente, pero no únicamente, de su estructura. Un gran número de enzimas encontradas en varias especies de microorganismos son requeridas para la realización de varias rutas catabólicas que conducen a la degradación completa hasta CO_2 y agua de dichas sustancias (Pagga, 1997).

Se ha demostrado que numerosos géneros de microorganismos pueden oxidar a los HAP de bajo peso molecular, como naftaleno, acenafteno y fenantreno, mientras que

son relativamente pocos géneros que biodegradan HAP de alto peso molecular, como el BaP.

Bacterias: Se conoce poca información acerca de la oxidación de BaP por bacterias. Hasta la fecha, no se sabe de bacterias aisladas que puedan utilizar al BaP como sustrato que soporte el crecimiento. Sin embargo, experimentos en cultivo líquido han demostrado que ciertos géneros pueden biodegradar BaP (oxidar parcialmente) en presencia de una fuente alterna de carbono. Ye y col. (1996), observaron una disminución del 5% en la concentración inicial de BaP (10 mg L^{-1}) después de 168 h de incubación con *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 y flouranteno como sustrato alterno. Sin embargo, en presencia de extracto de levadura (100 mg L^{-1}) se incrementa significativamente (40%) la biodegradación de BaP. En un experimento aparte, realizado con *S. paucimobilis* EPA 505 con $0.4 \text{ mg BaP L}^{-1}$ y glucosa, se encontró una producción significativa de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de cultivos incubados con $[7]^{14}\text{C-BaP}$, sugiriendo la hidroxilación y ruptura del anillo bencénico en los carbonos 7,8,9 y 10.

También ha sido reportada la mineralización del BaP por bacterias, Chen y Aitken (1999), demostraron la importancia de la adición de un co-sustrato en la mineralización del BaP. En cultivos con *Pseudomonas saccharophilia* P15 sin pre-incubación con algún co-sustrato no observaron mineralización del BaP después de 48 h; en cambio, con células pre-incubadas con fenantreno y salicilato obtuvieron el 30 y 20% de ^{14}C , respectivamente, en forma de $^{14}\text{CO}_2$. Con base en estos resultados, Chen y Aitken (1999), propusieron que la falta de mineralización de BaP observada en los cultivos sin inducción previa se debió a la lenta tasa de biodegradación de los HAP de alto peso molecular estudiados como sustratos alternos. A diferencia de esto, la exposición previa de la cepa a un HAP de bajo peso molecular como el fenantreno, y a los productos de transformación de los HAP (salicilato) pueden ser importantes para la inducción de la síntesis de las enzimas utilizadas para la degradación de los compuestos que no son utilizados como fuente de carbono, como el BaP.

En otro estudio Aitken y col. (1998), obtienen a partir de varios sitios contaminados, 11 cepas aisladas con la capacidad de biodegradar BaP, identificados como *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp. y *Sphingonomas* sp. Dos cepas del género *Pseudomonas* y una cepa de *Bacillus cereus* produjeron menos del 3% de $^{14}\text{CO}_2$ del $[7]^{14}\text{C}$ -BaP, sin embargo, observaron una disminución en la concentración de BaP (no marcado) sugiriendo que la ruptura del anillo no ocurrió en la posición 7,8 para el caso de estos aislados. Para el resto de las cepas estudiadas, encontraron recuperaciones entre el 9 y 37% del ^{14}C en forma de $^{14}\text{CO}_2$, después de 24 h de cultivo.

Se ha reportado que el BaP puede ser biodegradado por otras bacterias incluyendo *Rhodococcus* sp., *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, así como cultivos mixtos de *Pseudomonas* sp. y *Flavobacterium* sp. (Bouchez y col., 1995; Schneider y col., 1996; Juhasz y col., 1997; Stringfellow y Alvarez-Cohen, 1999; Juhasz y col., 2002). Kastner y col. (1998), sugirieron que bacterias de los géneros *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Gordonia* pueden tener un papel importante en la degradación de HAP de alto peso molecular en suelos.

Hongos: El metabolismo fúngico de degradación de los HAP de bajo y alto peso molecular ha sido estudiado extensamente. Se han reportado numerosos géneros de hongos ligninolíticos y no ligninolíticos con la habilidad de biodegradar HAP, dentro de los que se encuentran *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Fusarium solani*, *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus terreus* y *Penicillium janthinellum*, entre otros (Pothuluri, y col., 1996; Bezalel y col., 1996; Wunch y col., 1997; Launen y col., 1999; Veignie y col., 2002; Capotorti y col., 2004; Tekere y col., 2005; Dzul-Puc y col., 2005).

El hongo *P. chrysosporium* se ha convertido en el modelo de estudio para la biodegradación de los HAP y otros contaminantes ambientales (Rodríguez-Vázquez y col., 1999; Zheng y Obbard, 2002; Tekere y col., 2005; Dzul-Puc y col., 2005). Aun y cuando la mayoría de los estudios de biodegradación de BaP se han llevado a cabo en cultivo líquido (Tabla 1.9), los hongos filamentosos están muy bien

adaptados para crecer en hábitats terrestres, de hecho, los hongos son una buena herramienta de bioaumentación en ambientes sólidos como el suelo y los sedimentos.

Tabla 1.9 Biodegradación de BaP en cultivo líquido por hongos ligninolíticos y no ligninolíticos

Hongo	Sustrato alterno	BaP inicial	Biodegradación (BaP / tiempo)	Productos de metabolismo	Referencia
Ligninolíticos					
<i>Bjerkandera</i> sp. BOS55	Glucosa	20 mg L ⁻¹	20 mg L ⁻¹ en 15 días	8.4% ¹⁴ C en ¹⁴ CO ₂ 70% ¹⁴ C en H ₂ O	Kotterman y col., 1998
<i>Calocybe indica</i>	Tween 80 Antraceno y pireno	10 mg L ⁻¹	9 mg L ⁻¹ en 6 semanas		Steffen y col., 2002
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Glicerol	76 μg L ⁻¹ ([7] ¹⁴ C-BaP)	24 días	3% ¹⁴ CO ₂ , 22% ¹⁴ C en biomasa	Barclay y col., 1995
<i>Pleurotus ostreatus</i>		[7,10] ¹⁴ C-BaP	11 días	0.19% ¹⁴ CO ₂	Bezalel y col., 1996a
<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Tween 80 Antraceno y pireno	10 mg L ⁻¹	9.5 mg L ⁻¹ en 1 semana	1% ¹⁴ C en ¹⁴ CO ₂	Steffen y col., 2002
<i>Trametes versicolor</i>	Aserrín	20 mg L ⁻¹	4.4 mg L ⁻¹ en 72 horas	0.22% ¹⁴ C en ¹⁴ CO ₂	Boyle y col., 1998

Continuación Tabla 1.9

Hongo	Sustrato alterno	BaP inicial	Biodegradación (BaP / tiempo)	Productos de metabolismo	Referencia
No ligninolíticos					
<i>Aspergillus niger</i>		25 mg L ⁻¹	0.75 mg L ⁻¹ en 17 días		Wunch y col., 1997
<i>Aspergillus ochraceus</i>		25 mg L ⁻¹	12.5 mg L ⁻¹ en 17 días		Wunch y col., 1997
<i>Aspergillus parasiticus</i>		25 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹ en 17 días		Wunch col., 1997
<i>Aspergillus terreus</i>	Sacarosa	25 mg L ⁻¹	6.9 mg L ⁻¹ en 9 días	Benzopirenilsulfato	Capotorti y col., 2004
<i>Cunninghamella elegans</i>	CSD ^b	500 mg L ⁻¹	96 horas	<i>trans</i> -7,8- dihidroxiBaP <i>trans</i> -9,10- dihidroxiBaP BaP-1,6-quinona BaP-3,6-quinona 9-hidroxiBaP 3-hidroxiBaP	Cerniglia y Gibson, 1979
<i>Fusarium solani</i>	Glucosa	100 mg L ⁻¹	58.3 mg L ⁻¹ en 30 días		Verdin y col., 2004
<i>Fusarium solani</i>	Glucosa	188 mg L ⁻¹	15 horas	1.2% CO ₂	Veignie y col., 2002
<i>Penicillium janthinellum</i>	MYPD ^a	100 mg L ⁻¹	7 días	9-hidroxiBaP	Launen y col., 1995
<i>Trichoderma viride</i>	Glucosa	100 mg L ⁻¹	50 mg L ⁻¹ en 30 días		Verdin y col., 2004

^a MYDP; medio de cultivo con extracto de malta, extracto de levadura, dextrosa y peptona

^b CSD; caldo de cultivo Sabouraud dextrosa

En la Tabla 1.10 se presentan los resultados de estudios de biodegradación de BaP en cultivo sólido por hongos ligninolíticos y no ligninolíticos. Por ejemplo, *P. chrysosporium* puede biodegradar BaP en suelos suplementados con fuentes de carbono como bagazo de caña y aserrín de pino, sin embargo, el nivel de biodegradación del BaP a partir del suelo depende fuertemente del tipo de sustrato

ligninocelulolítico utilizado debido a la actividad de sorción que modifica la biodisponibilidad del BaP (Dzul-Puc y col., 2005). Rodríguez-Vázquez y col. (1999), reportaron que *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* y *T. versicolor*, en cultivos con suelo y bagazo de caña como soporte y sustrato, respectivamente, biodegradan más del 40% de los 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹. Steffen y col. (2002), reportan que *Agrocybe praecox* TM 70.84 y *Nematoloma frowardii* DSM 11239 biodegradan 50 mg BaP (kg soporte seco)⁻¹ utilizando bagazo de trigo como soporte y sustrato.

Tabla 1.10 Biodegradación de BaP en cultivo sólido por hongos ligninolíticos y no ligninolíticos

Hongo	Soporte y sustrato	BaP inicial	Biodegradación (BaP / tiempo)	Productos de metabolismo	Referencia
Ligninolíticos					
<i>Agrocybe praecox</i>	Bagazo de trigo	50 mg Kg ⁻¹	12 semanas	4.7% ¹⁴ C en ¹⁴ CO ₂ 28. 1% ¹⁴ C en H ₂ O	Steffen y col., 2002
<i>Bjerkandera</i> sp	Arena + maltosa	0.1 mg Kg ⁻¹	0.033 mg Kg ⁻¹	2.1% en ¹⁴ CO ₂ 9% ¹⁴ C en H ₂ O	Rama-Mercier y col., 1998
<i>Nematoloma frowardii</i>	Bagazo de trigo	50 mg Kg ⁻¹	12 semanas	14.7% ¹⁴ C en ¹⁴ CO ₂ 21. 6% ¹⁴ C en H ₂ O	Steffen y col., 2002
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Suelo + bagazo de caña	500 mg Kg ⁻¹	220 mg Kg ⁻¹ en 18 días		Dzul-Puc y col., 2005
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Suelo + bagazo de caña	500 mg Kg ⁻¹	225 mg Kg ⁻¹ en 18 días	10 mg CO ₂ g de soporte	Rodríguez-Vázquez y col., 1999
<i>Pleurotus</i> sp. Florida	Paja	250 mg Kg ⁻¹	125 mg Kg ⁻¹ en 15 semanas	39% ¹⁴ C en ¹⁴ CO ₂	Wolter y col., 1997
<i>Trametes versicolor</i>	Suelo + paja de alfalfa	400 mg Kg ⁻¹	41% en 72 horas	0.33% ¹⁴ C en ¹⁴ CO ₂ 11% ¹⁴ C en H ₂ O	Boyle y col., 1998

Continuación Tabla 1.10

Hongo	Soporte y sustrato	BaP inicial	Biodegradación (BaP / tiempo)	Productos de metabolismo	Referencia
No ligninolíticos					
<i>Aspergillus niger</i>	Arena + maltosa	0.1 mg Kg ⁻¹	0.008 mg Kg ⁻¹	7% ¹⁴ C en H ₂ O	Rama-Mercier y col., 1998
<i>Coniotryrium</i> sp	Suelo + glucosa	134 mg Kg ⁻¹	71 mg Kg ⁻¹		Potin y col., 2004
<i>Cunninghamella elegans</i>	Arena + maltosa	0.1 mg Kg ⁻¹	0.047 mg Kg ⁻¹	22% ¹⁴ C en H ₂ O	Rama-Mercier y col., 1998
<i>Fusarium</i> sp	Suelo + glucosa	134 mg Kg ⁻¹	68 mg Kg ⁻¹		Potin y col., 2004

La mayoría de los mecanismos de biodegradación de BaP por hongos reportados son cometabólicos, en donde una fuente de carbono alterna es utilizada como fuente de carbono y energía, mientras que el HAP es transformado como consecuencia de su crecimiento. Sin embargo, se ha reportado que cepas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus parasiticus* biodegradan 50 mg BaP L⁻¹ en cultivo líquido en ausencia de otra fuente alterna de carbono (Wunch y col., 1997).

De los diversos grupos de hongos ligninolíticos y no ligninolíticos que tienen la capacidad de oxidar al BaP, solo algunas cepas han demostrado transformaciones del BaP a metabolitos polares después de su crecimiento en fuentes alternativas de carbono (Boyle y col., 1998; Kotterman y col., 1998; Rama-Mercier y col., 1998; Steffen y col., 2002); sin embargo, solo unos cuantos géneros pueden mineralizarlo. Barclay y col. (1995), reportaron la mineralización de BaP por cultivos de *P. chrysosporium* después de su crecimiento en cultivo líquido con glicerol, el 3% de ¹⁴CO₂ fue producido después de 24 días de incubación. Wolter y col. (1997), demostraron que *Pleurotus* sp. mineralizó el 39% del ¹⁴C-BaP en cultivo sólido con paja de trigo, después de un periodo de incubación de 15 semanas; encontrando que las tasas de mineralización de BaP fueron independientes a las concentraciones

iniciales de BaP probadas (5 a 125 mg Kg⁻¹) y que el 21% del ¹⁴C se localizó en residuos celulares que no pudieron ser extraídos. Rama-Mercier y col. (1998), observaron una disminución en la concentración de BaP después de incubar con *T. versicolor* y *Bjerkandera* sp. BOS55, como resultado encontraron el 2.1 y 0.5%, respectivamente, del ¹⁴C-BaP en forma de ¹⁴CO₂.

Muchos hongos han demostrado tener la capacidad para oxidar el BaP de forma similar a los sistemas enzimáticos de los mamíferos. El metabolismo de BaP en los mamíferos está mediado por la monooxigenasa del citocromo P450 microsomal. De la oxidación del BaP por hongos se obtienen *trans*-dihidrodióles, lo que soporta la hipótesis de que podría estar mediada por el citocromo P-450 (Cerniglia y Gibson, 1980).

1.3.2 Factores limitantes en la biodegradación de BaP

Un gran número de factores físicos, químicos, biológicos o ambientales pueden influir en la tasa y el nivel de biodegradación del BaP.

Nutrientes. El nivel de nutrientes requeridos para la biodegradación de los HAP es similar a los necesarios para otros contaminantes orgánicos como los compuestos del petróleo (Bamforth y Singleton, 2005). Las cantidades de nitrógeno (N) y fósforo (P) requeridas para el crecimiento microbiano óptimo y la biodegradación de hidrocarburos han sido estimadas a partir de la relación C:N:P en la biomasa, la cual se encuentra entre 100:15:3 (Zitrides, 1978) y 120:10:1 (Alexander, 1977). Sin embargo, un estudio reciente demostró que el crecimiento microbiano y la biodegradación de creosote ocurren bajo una relación C:N de 25:1 la cual es mucho mayor a aquellas predichas a partir de la relación en la biomasa (5:1). Es importante tomar en cuenta para la realización de estudios de biodegradación de HAP con hongos, que éstos son capaces de recircular eficientemente los nutrientes (especialmente el nitrógeno) y que un exceso de nutrientes puede inhibir su metabolismo. Así mismo, las enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca, que oxidan a los HAP de alto peso molecular son producidas bajo

condiciones de deficiencia nutricional, por lo general bajos niveles de nitrógeno (Bogan y col., 1996).

Temperatura. Dentro de los factores ambientales que afectan a la biodegradación se encuentra la temperatura, la cual tiene un efecto considerable en la habilidad de los microorganismos para biodegradar BaP. Su solubilidad en agua aumenta al incrementarse la temperatura, lo cual aumenta su biodisponibilidad. Como consecuencia, la solubilidad del oxígeno disminuye al incrementarse la temperatura, por lo que la actividad metabólica de los microorganismos aerobios se reduce (Margesin y Schinner, 2001).

La biodegradación de los HAP puede ocurrir en un amplio intervalo de temperaturas, sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la eficiencia de transformación se han enfocado a temperaturas mesófilas, en vez de bajas y altas temperaturas. Los microorganismos se han adaptado para metabolizar HAP bajo temperaturas extremas, por ejemplo, se ha reportado biodegradación de naftaleno y fenantreno a partir de crudo en agua de mar a temperaturas menores a los 0 °C (Siron y col., 1995). En comparación, se ha reportado que alrededor de los 50 °C y cerca de los 75 °C, es la temperatura óptima las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa de hongos ligninolíticos, respectivamente, encontrándose una biodegradación del 90% en una composta contaminada con HAP a estas temperaturas (Lau y col., 2003).

Disponibilidad de oxígeno. Aun y cuando es bien conocido que la biodegradación de los HAP se puede llevar a cabo bajo condiciones aerobias y anaerobias, la mayoría de los estudios se han enfocado en la dinámica del metabolismo aerobio de estos contaminantes. Debido a que durante la biodegradación aerobia de los HAP, el oxígeno es parte integral de la acción de las enzimas mono- y dioxigenasas durante la oxidación inicial de los anillos aromáticos, es necesario mantener un nivel adecuado de oxígeno durante la biodegradación de los HAP (Bamforth y Singleton, 2005).

Los HAP son contaminantes comunes en ambientes anaerobios como acuíferos (Meckenstock y col., 2000) y sedimentos marinos (Ohkouchi y col., 1999). Aun en ambientes aerobios como suelos contaminados y sedimentos se pueden generar

zonas anaerobias. Esto es debido a que los contaminantes orgánicos estimulan a los microorganismos, produciendo un el agotamiento del oxígeno molecular durante la respiración aerobia. Este oxígeno no es restaurado a la misma tasa a la que es consumido, lo que produce zonas anaerobias próximas a la fuente de contaminación (Bamforth y Singleton, 2005). Se ha reportado que la biodegradación aerobia de hidrocarburos es mayor en un orden de magnitud que la encontrada en condiciones anaerobias (Rockne y Strand, 1998). Sin embargo, también ha sido reportado que las tasas de biodegradación anaerobia de HAP, bajo condiciones desnitrificantes, son comparables a las encontradas bajo condiciones aerobias (McNally y col., 1998).

Biodisponibilidad. La biodisponibilidad se puede definir como el efecto de factores fisicoquímicos y microbiológicos en la tasa y el nivel de biodegradación (Cerniglia, 1992). Los HAP son compuestos con baja biodisponibilidad debido a su baja solubilidad en agua (Semple y col., 2003), con lo cual se reduce su accesibilidad para su metabolismo en la célula microbiana (Fewson, 1988). Aunado a esto, en suelos contaminados los HAP pueden sorberse rápidamente en partículas minerales (como la arcilla) y materia orgánica (como los ácidos húmicos) en la matriz del suelo. Mientras mas tiempo estén los HAP en contacto con el suelo, mayor será su porción y menor su capacidad de extracción química y biológica (Hatzinger y Alexander, 1995).

Capacidad metabólica. El mayor factor limitante en la biodegradación del BaP es la capacidad metabólica de los microorganismos (Juhasz y Naidu, 2000). Una de las barreras metabólicas de los compuestos orgánicos es la carencia de enzimas catabólicas (Providenti y col., 1993). Como el BaP no puede ser utilizado como fuente de carbono y energía (Cerniglia, 1997), un sustrato que promueva el crecimiento debe ser suplementado para inducir la producción de éstas enzimas y la tasa y el grado de biodegradación del BaP es dependiente del tipo de sustrato adicionado (Juhasz y Naidu, 2000).

1.3.3 Metabolismo microbiano del BaP

Existen tres mecanismos fundamentales diferentes en el metabolismo aerobio de los HAP por microorganismos. En la Figura 1.5 se muestra un esquema de las principales rutas de biodegradación de HAP por bacterias y hongos adaptado de Cerniglia (1992). La base de estos mecanismos es la oxidación del anillo aromático, seguido de una serie de descomposiciones químicas del compuesto para formar metabolitos polares y/o CO₂.

Los microorganismos degradadores de HAP están ampliamente distribuidos en el ambiente, como en el suelo (bacterias y hongos no ligninolíticos) y en los materiales leñosos (hongos ligninolíticos).

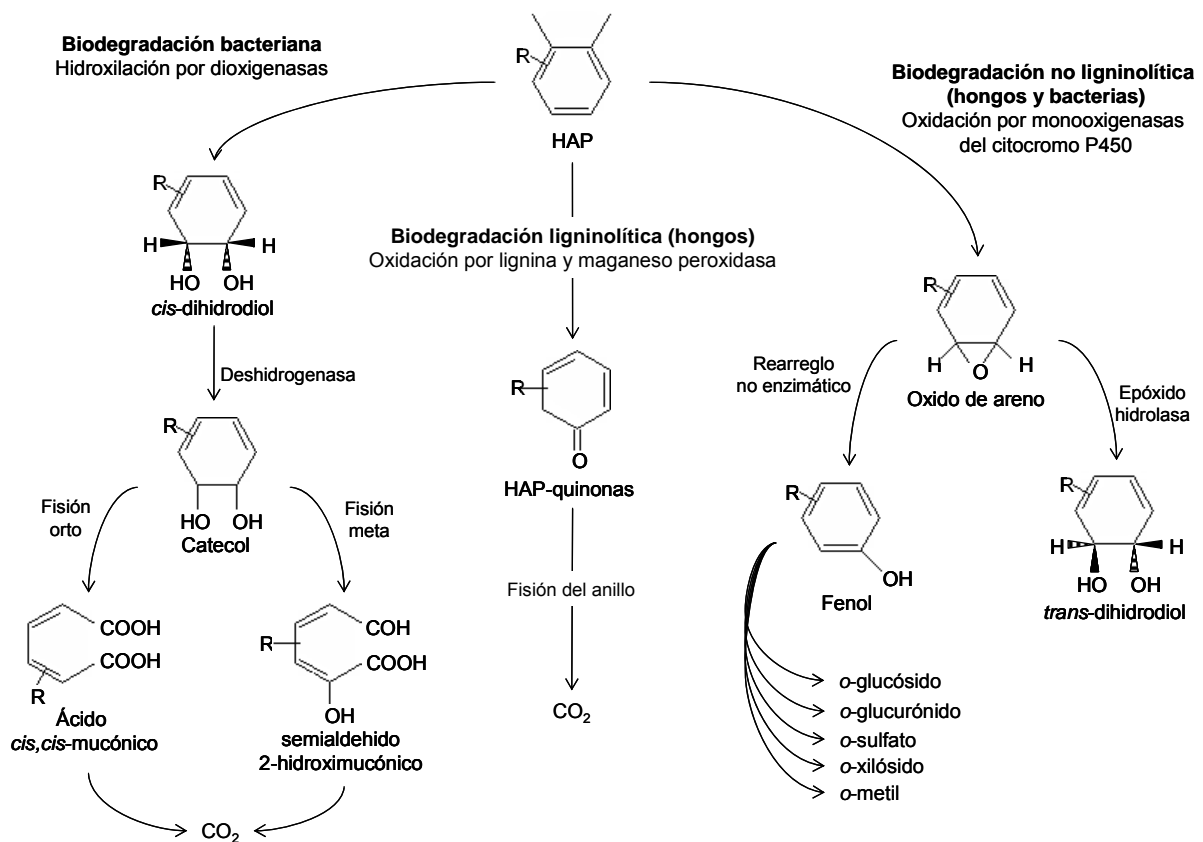


Figura 1.5 Rutas principales para de biodegradación aerobia de HAP por bacterias y hongos

1.3.3.1 Bacterias

El mecanismo principal para el metabolismo aerobio del BaP por bacterias es la oxidación inicial del anillo bencénico por la acción de la enzima dioxigenasa, produciendo *cis*-dihidrodiol, los cuales son deshidrogenados para formar intermediarios dihidroxilados, que posteriormente pueden ser metabolizados vía la formación de catecol y su sucesiva transformación hasta CO₂ y agua.

Hasta el momento no existen reportes sobre la capacidad de alguna bacteria para utilizar el BaP como fuente de carbono y energía. Sin embargo, experimentos en cultivo líquido han demostrado, que una gran diversidad de géneros bacterianos son capaces de biodegradar BaP utilizando dioxigenasas, cuando son incubadas en presencia de una fuente alterna de carbono, dentro de los que se encuentran *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium* (Walter y col., 1991; Ye y col., 1996; Schneider y col., 1996; Juhasz y col., 1997; Aitken y col., 1998; Chen y Aitken, 1999; Juhasz y col., 2002).

Si bien se han observado disminuciones en la concentración del BaP después de la incubación con varias cepas bacterianas, pocos estudios han encontrado metabolitos productos del catabolismo del BaP. Gibson y col. (1975) demostraron que la cepa *Beijernickia* B-836, después de haber crecido con succinato, en presencia de bifenilo, oxida el BaP hasta dihidrodiol. El dihidrodiol mas abundante fue identificado como *cis*-9,10-dihidroxi-9,10-dihidroBaP. La cepa de *Mycobacterium* RJGII-135 también presentó la capacidad de formar *cis*-7,8-benzo(a)pireno-dihidrodiol (Schneider y col., 1996). La formación posterior del ácido *cis*-4-(7-hidroxi-8-pirenil)-2-oxo-3-butenóico es debida a la fisión *meta* del compuesto hidroxilado. Este metabolito es transformado a su vez en el ácido 8-pireno-carboxílico, a través de varios pasos subsecuentes que no han sido bien caracterizados. Por otro lado, Schneider y col. (1996), aislaron en ácido 4,5-criseno-dicarboxílico, el cual es producto de la fisión *orto* del *cis*-4,5-dihidroxi-4,5-dihidroBaP, un producto alterno de la hidroxilación inicial.

En la Figura 1.6 se presenta la ruta de biodegradación de BaP propuesta para el metabolismo de *Mycobacterium vanbannelii* PYR-1 (Moody y col., 2004), *Mycobacterium* sp. RGJII-135 (Schneider y col., 1996) y *Beijernickia* sp. B-836 (Gibson y col., 1975).

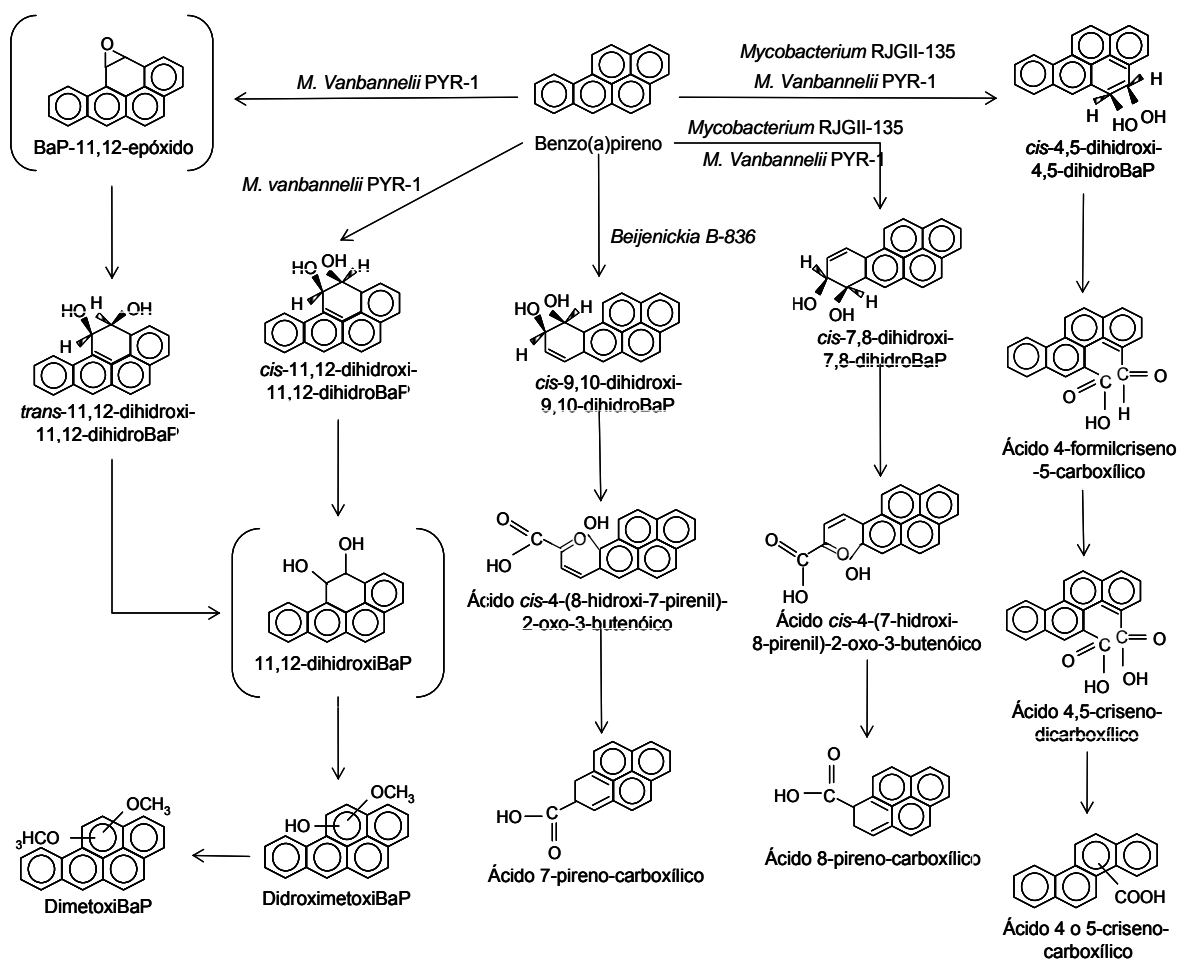


Figura 1.6 Ruta de biodegradación de BaP por bacterias *M. vanbaanelii* PYR-1, *Mycobacterium* sp. RGJII-135 y *Beijernickia* sp. B-836

Existen reportes sobre algunas cepas bacterianas, que oxidan HAP también por la acción de las enzimas monooxigenasas del citocromo P450 para la formación de *trans*-dihidrodióles. Moody y col. (2004), reportaron que *M. vanbaanelii* PYR-1 oxida el BaP inicialmente con dioxigenasa y monooxigenasas, después de 96 horas de

incubación, encontraron en el medio de cultivo los metabolitos *cis*-4,5-dihidro-4,5-dihidroxibenzo(a)pireno, *cis*-11,12-dihidro-11,12-dihidroxibenzo(a)pireno, *trans*-11,12-dihidro-11,12-dihidroxibenzo(a)pireno, 10-oxobenzo-(def)-9-crisenona y derivados hidroximetilados y dimetoxilados de BaP, la presencia de los metabolitos demuestra la versatilidad de *M. vanbaanelii* en la biodegradación de BaP.

1.3.3.2 Hongos ligninolíticos

Los hongos de pudrición blanca son un grupo fisiológico más que taxonómico, el cual comprende a los hongos que son capaces de degradar la lignina contenida en los sustratos ligninocelulolíticos. La lignina es un compuesto recalcitrante y es mineralizado bajo procesos oxidativos aerobios, durante los cuales no hay ganancia de energía.

Los hongos de pudrición blanca producen una o más de las tres enzimas extracelulares esenciales para la degradación de la lignina. Estas enzimas son comúnmente denominadas enzimas de modificación de lignina o ligninolíticas, dentro de las que se encuentran la lignin peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Lac) (Mester y Tien, 2000).

Bajo condiciones ligninolíticas, los hongos de pudrición blanca pueden oxidar HAP mediante la producción de radicales libres (hidroxilo) mediante la donación de un electrón, el cual oxida el anillo aromático. Esto genera principalmente quinonas y ácidos en lugar de dihidrodioles, como productos finales (Figura 1.7).

Existe un interés especial en la utilización de estos hongos en la biodegradación de HAP, debido a que tienen baja especificidad por un sustrato y por lo tanto tienen la capacidad de oxidar hasta el compuesto más recalcitrante. Además, las enzimas involucradas son extracelulares, y son teóricamente capaces de difundirse en la matriz del suelo o sedimentos y oxidar HAP con baja biodisponibilidad (Bamforth y Singleton, 2005).

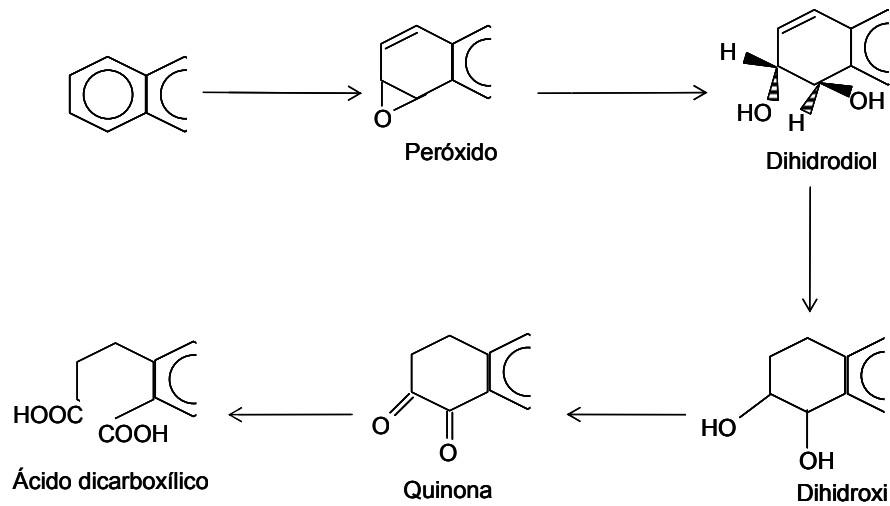


Figura 1.7 Ruptura del anillo aromático por enzimas ligninolíticas

Las etapas iniciales del metabolismo de BaP por hongos de pudrición blanca y las etapas subsecuentes de mineralización son procesos distintos. Estos hongos metabolizan al BaP mucho más rápido de lo que lo mineralizan. La mineralización es fuertemente inhibida por la presencia de nitrógeno, mientras que la producción de metabolitos polares no es inhibida por la presencia de este nutriente (Boyle y col., 1998).

Estudios sobre los hongos ligninolíticos han demostrado que los HAP deben ser biodegradados por una combinación de enzimas ligninolíticas, monooxigenasas del citocromo P450 y epóxido hidrolasas para ser completamente mineralizado (Bezalel y col., 1997).

Experimentos con extractos enzimáticos han demostrado la participación de las enzimas ligninolíticas en la oxidación de los HAP. Preparaciones extracelulares de LiP provenientes de *P. chrysosporium* demostraron ser capaces de oxidar a los HAP (Bumpus, 1989). Más recientemente, se ha demostrado que LiP purificada de *Nematoloma forwardii* oxida antraceno y pireno en presencia de alcohol veratrílico (Guenther y col., 1998). Se ha propuesto que el metabolismo de los HAP mediado por LiP, ocurre por la oxidación de un electrón para la producción de quinonas. Por otro lado, las enzimas MnP y lacasa parecen ser las enzimas ligninolíticas

predominantes durante el metabolismo de estos compuestos, por lo que se ha enfocado la atención a estas enzimas. La enzima MnP purificada (en un sistema de peroxidación de MnP-lípidos) de *P. chrysosporium* tiene la capacidad de oxidar 12 HAP de entre 3 a 6 anillos (Bogan y Lamar, 1995; Bogan y col., 1996a). Otra evidencia sugiere que el complejo lípido-MnP de *Phanerochaete laevis* oxida HAP hasta metabolitos polares en donde no se presenta una acumulación significativa de quinonas (Bogan y Lamar, 1996). En contraste, la enzima MnP de *N. forwardii* (en complejo lípido-MnP) oxida antraceno y pireno hasta quinonas, que no fueron metabolizadas, pero la transformación de algunos productos hidroxilados sí se llevó a cabo (Guenther y col., 1998). La lacasa purificada de *T. versicolor* fue capaz de oxidar HAP de 3 a 5 anillos en presencia de 1-hidroxibenzotriazol y ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) (Collins y col., 1996; Majcherczyk y col., 1998). Pickard y col. (1999), reportaron que una lacasa purificada de *Corioloopsis gallica* también fue capaz de oxidar estos compuestos en presencia de sustratos similares.

1.3.3.3 Hongos no ligninolíticos

En la Figura 1.8 se presenta la ruta de degradación de BaP propuesta con base en los metabolitos encontrados en cultivos con *C. elegans* (Cerniglia y Gibson, 1979), *A. ochraceus* (Datta y Samanta, 1988), *P. janthinellum* (Launen y col., 1995) y *A. terreus* (Capotorti y col., 2004).

El primer paso en el metabolismo de los HAP por hongos no ligninolíticos es la oxidación del anillo aromático por acción de una monooxigenasa, produciendo un óxido de areno inestable. El complejo enzimático que cataliza la formación de óxidos de areno contiene una enzima unida a la membrana plasmática inducible, citocromo P450 (Omura, 1999). Esta ruta es similar al metabolismo de HAP por mamíferos. En comparación con la oxidación del anillo aromático por enzimas dioxigenasas de las bacterias que forman los *cis*-dihidrodióles, las monooxigenasas incorporan solo un átomo de oxígeno molecular al anillo para formar el óxido de areno. Inmediatamente después, la enzima epóxido hidrolasa cataliza la adición de una molécula de agua al

óxido de areno produciendo *trans*-hidrodioles. La mayoría de los metabolitos producidos a partir de la oxidación de los HAP por hongos son menos tóxicos para otros organismos que los compuestos originales, por lo tanto el resultado es la detoxificación. Sin embargo, pequeñas cantidades de compuestos mutagénicos y carcinógenos, son formados durante el metabolismo fúngico de algunos HAP no sustituidos o metilados (Sutherland, 1992).

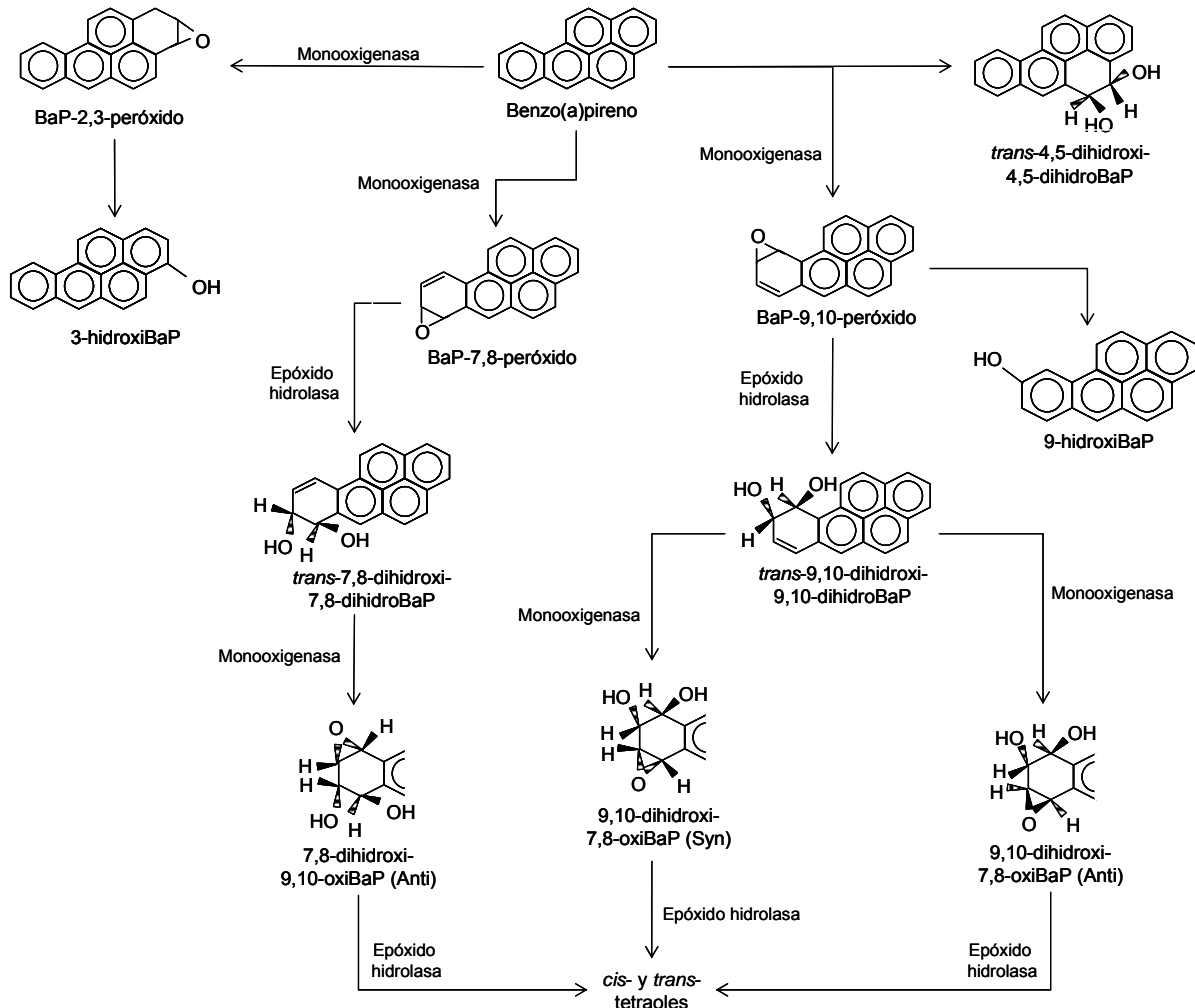


Figura 1.8 Ruta de biodegradación de BaP por los hongos *C. elegans*, *A. ochraceus*, *P. janthinellum* y *A. terreus*

Debido a la complejidad estructural de los HAP durante su metabolismo se produce mas de un isómero, se han encontrado *trans*-9,10-dihidrodiolbenzo(a)pireno y el

trans-4,5-dihidrodiolbenzo(a)pireno, los cuales poseen propiedades carcinógenas menores a las del BaP y el *trans*-7,8-dihidrodiolbenzo(a)pireno que es tan carcinógeno como el BaP (Cerniglia, 1992).

Por otro lado, los óxidos de areno pueden ser convertidos a derivados fenólicos por medio de re-arreglos no enzimáticos (Cerniglia, 1997), como los isómeros 3-hidroxibenzo(a)pireno y 9-hidroxibenzo(a)pireno los cuales son compuestos con bajos índices de mutagenicidad (Sutherland, 1992). Posteriormente los dihidrodioles y dihidrodio epóxidos son convertidos a catecoles inestables, los cuales se autooxidan a quinonas. Se han reportado la formación de 1,6-benzo(a)pirenona y la 3,6-benzo(a)pirenona a partir de la biodegradación de BaP por hongos (Juhász y Naidu, 2000). Las quinonas al ser reducidas poseen propiedades carcinógenas (Penning, 1993).

1.4 Características de los hongos filamentosos estudiados

Aspergillus terreus

Características macroscópicas: las colonias incubadas en agar Czapek con extracto de levadura (CYA) y CYA con 20% de sacarosa son de color marrón canela o marrón; a veces se produce un pigmento amarillento que se difunde. Colonias aterciopeladas, lanosa o a veces flocosa en la zona central, la cual puede ser plana o con surcos radiales. Las colonias incubadas en agar extracto de malta son poco densas, de color anaranjado pálido a gris anaranjado o color carne; micelio blanco apenas visible; reverso en tonos amarillentos; textura granular o algo flocosa (Abarca, 2000).

Características microscópicas: cabezas conidiales biseriadas, en columnas compactas; estipes o partes medias de pared lisa, hialinos. Vesículas de forma variable, esférica o subglobosa; células soporte ocupando la mitad o dos tercios de la vesícula. Conidios lisos, globosos o subglobosos (Abarca, 2000).

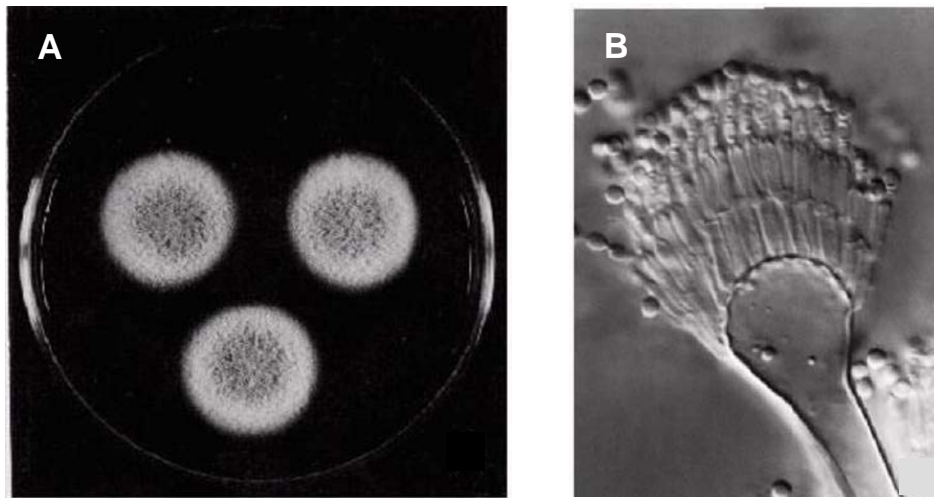


Figura 1.9 *Aspergillus terreus* A) morfología macroscópica B) morfología microscópica (Fotos obtenidas de Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS))

Aspergillus niger

Características macroscópicas: las colonias inoculadas en CYA son de color negro o marrón muy oscuro; reverso incoloro a amarillo; colonia densa, granular a flocosa. En agar extracto de malta las colonias son de color negro, el micelio blanco apenas visible; reverso incoloro; textura granular flocosa (Abarca, 2000).

Características microscópicas: Cabezas conidiales biseriadas y radiales; estipes o partes medias de paredes gruesas, lisos, hialinos, amarillentos o de color marrón pálido en especial cerca de la vesícula. Vesícula casi esférica; células soporte ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias (Abarca, 2000).

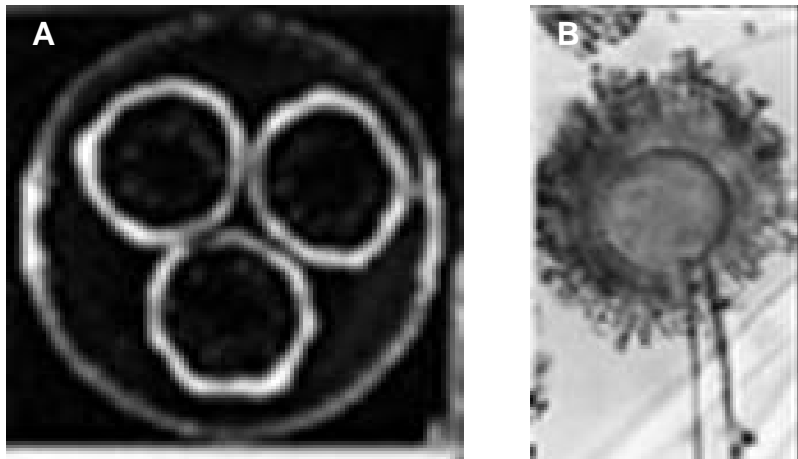


Figura 1.10 *Aspergillus terreus* A) morfología macroscópica B) morfología microscópica (Fotos obtenidas de Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS))

Phanerochaete chrysosporium

Características macroscópicas: basidiocarpos blancos a salmonados de máximo 0.25 mm de espesor entremezclados sobre una delgada capa de hifas monomíticas blancas. Las colonias inoculadas en CYA son de color blanco; reverso incoloro a blanco; colonia densa, granular a flocosa.

Características microscópicas: el micelio está formado por hifas septadas simple entre 3 a 9 μm de diámetro con ramificaciones escasas así como la presencia de terminales de pared gruesa o clamidiosporas intercaladas de 50 a 60 μm de diámetro. Los blastoconidios son redondos o elípticos de 6 a 9 μm de diámetro producidas de por conidióforos ramificados poco diferenciados.

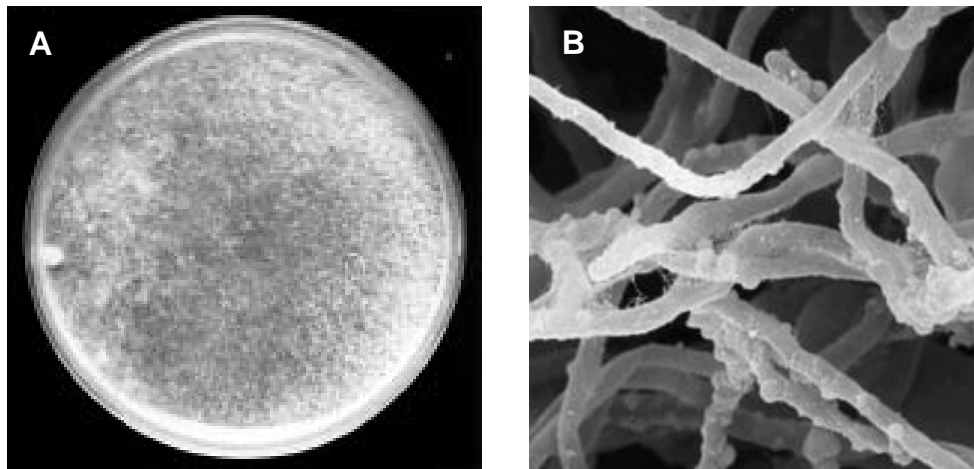


Figura 1.11 *Phanerochaete chrysosporium* A) morfología macroscópica B) morfología microscópica (fotos obtenidas del Museo Nacional de Ciencia Natural y Joint Genome Institute)

1.5 Cultivo sólido y cultivo líquido

Los procesos de cultivo en sistemas sólidos pueden ser definidos como “el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) sobre materiales sólidos húmedos en ausencia de agua libre fluyendo” (Cannel y Moo-Young, 1980). Esta es constituido por una matriz sólida porosa la cual puede ser o no ser biodegradable, con una gran superficie por unidad de volumen en la cual puede haber crecimiento microbiano en la interfase sólido/gas. Dentro de los soportes biodegradables o sustratos fermentables tradicionales para cultivo sólido se incluyen una amplia variedad de productos agrícolas como arroz, trigo, cebada, granos, frijoles, maíz y soya. Sin embargo, se utilizan sustratos no tradicionales los cuales pueden ser de interés industrial, incluyendo una gran cantidad de desechos agrícolas, forestales y alimenticios.

La utilización de un soporte sólido es afectado por varios factores físicos y químicos, como el tamaño de partícula, la porosidad y la composición química, el costo y la disponibilidad son otros factores importantes que hay que tomar en cuenta. Como consecuencia, la selección de un adecuado material sólido juega un papel importante en el desarrollo de un eficiente sistema de cultivo sólido (Couto y col., 2002).

Por lo anterior, en el presente trabajo se probaron espuma de poliuretano (EPU) y agrolita como soportes para estudiar la biodegradación de BaP en cultivo sólido. La EPU es un polímero formado por unidades repetidas de uretano, los uretanos son derivados de los ácidos carbámicos los cuales existen solo en la forma de ésteres (Howard, 2002). En la Figura 1.12A se presenta una micrografía de la estructura de la EPU.

La EPU ha sido ampliamente utilizada como soporte en cultivos sólidos para la producción de metabolitos y enzimas, como ácido cítrico, amilasa, lacasa, tanasa (Pintado y col., 1998; Murado y col., 1997; Couto y col., 2002; van de Lagemaat y Pyle, 2001). También se han utilizado para la biodegradación de cafeína por *Aspergillus tamarii* (Hakil y col., 1999), la biodegradación del colorante Poly R-478 por *P. chrysosporium* (Couto y col., 2000), de hidrocarburos por *Prototheca zopfii* en un birreactor de contacto (Suzuki y Yamaya, 2005) y de hexadecano por *A. niger* en fermentación en cultivo sólido (Volke-Sepúlveda y col., 2003; Volke-Sepúlveda y col., 2005).

La agrolita es una roca volcánica cristalina compuesta principalmente por silicatos, que se expande cerca de 20 veces su tamaño original por acción de altas temperaturas. La agrolita expandida tiene una estructura característica compuesta de pequeños e irregulares poros, los que le confieren su alta capacidad de absorción, las sustancias que pueden ser retenidas por la agrolita pueden ser recuperadas, por su composición química la agrolita es inerte (Rouliá y col., 2003); estas propiedades la hacen un buen soporte para los cultivos sólidos. La agrolita ha sido principalmente utilizada en cultivos hidropónicos y como sorbente de contaminantes (Alkan y col., 2005).

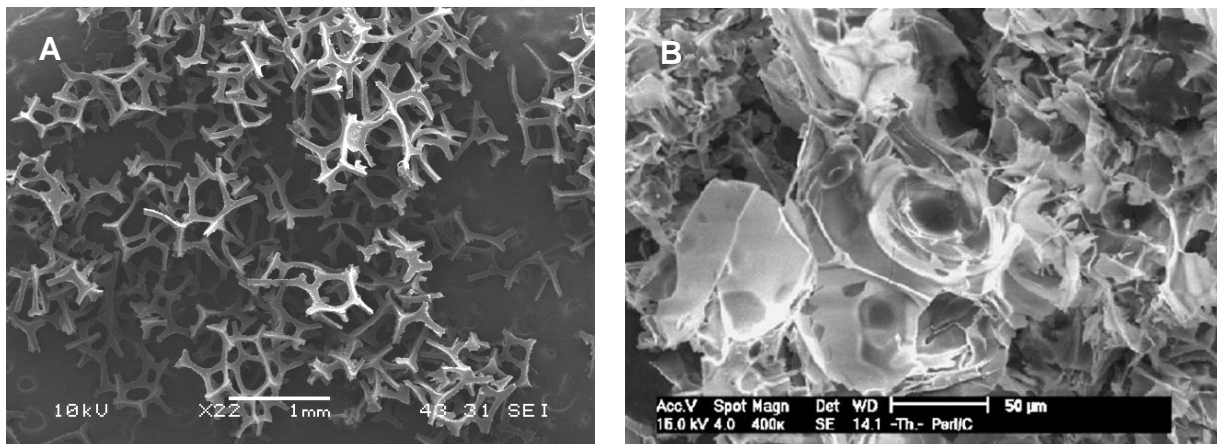


Figura 1.12 Estructura microscópica de: A) EPU y B) agrolita (fotografía tomada de Roulia y col., 2003)

Los cultivos líquido o sumergido, comprenden una amplia variedad de procesos microbianos agitados o no agitados, en donde la biomasa queda completamente rodeada del medio de cultivo líquido. La principal diferencia entre el cultivo sólido y el cultivo líquido está relacionada con varias características fisicoquímicas (Viniegra-González., 1997). Tales diferencias dan información importante de las ventajas y desventajas del cultivo sólido con respecto a los procesos en cultivo líquido convencionales. En la Tabla 1.11 se presenta la comparación entre el cultivo sólido y el cultivo líquido (Raimbault, 1998).

Durante los últimos años, se ha acumulado evidencia que sugiere que los procesos microbianos en cultivo sólido son cualitativamente distintos a los procesos en cultivo líquido. Esto implica que la fisiología microbiana se lleva a cabo con diferente regulación en cada caso, por lo menos en un selecto número de casos relacionados con la producción de esporas, enzimas y metabolitos secundarios (Viniegra-González, 1997).

Tabla 1.11 Comparación entre cultivo sólido y cultivo líquido

<i>Factor</i>	<i>Cultivo líquido</i>	<i>Cultivo sólido</i>
Sustrato	Soluble, ejemplo azúcares	Insoluble, ejemplo polímeros
Condiciones de asepsia	Esterilización térmica y buen control aséptico	Tratamiento con vapor, algunas veces condiciones no estériles
Agua y efluentes	Consumo de grandes cantidades de agua. Altos volúmenes de efluentes contaminantes	Consumo de agua limitado, baja actividad de agua. No efluentes, bajo contaminación
Calor metabólico	Fácil control de la temperatura	Baja capacidad de transferencia de calor,
Aireación	Limitación en la solubilización de oxígeno, se requieren altos volúmenes de aire	Facilidad de aireación y grandes superficies de intercambio aire/soporte
Control de pH	Fácil control	Amortiguadores sólidos
Agitación	Por agitación mecánica buena homogenización	Condiciones estáticas
Escalamiento	Equipos industriales disponibles	Se necesita ingeniería y diseño de equipo
Inoculación	Inoculación fácil, procesos continuos	Inoculación por esporas, procesos por lotes
Contaminación	Riesgo de contaminación en cultivos puros	Riesgo de contaminación en cultivos con hongos de baja tasa de crecimiento
Concentración de sustratos y productos	Bajos	Altos

Las bacterias, levaduras y hongos pueden crecer en soportes sólidos, sin embargo, los hongos filamentosos debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas, son los mejor adaptados para estas condiciones y dominan la investigación en cultivo sólido. El crecimiento de los hongos a través de la formación

de hifas así como su tolerancia condiciones de baja actividad de agua (A_w) y altas presiones osmóticas hacen a los hongos eficientes y competitivos en los cultivos sólidos (Raimbault, 1998). El crecimiento a través de hifas permite que los hongos filamentosos penetren en los soportes. Una estructura celular presente en la punta de la hifa así como las ramificaciones del micelio permiten fijarse firmemente a una superficie sólida. Los hongos no pueden transportar a los sustratos, pero el crecimiento de las hifas permite el contacto entre el sustrato y las hifas. El micelio sintetiza y excreta al medio grandes cantidades de enzimas, las cuales generan productos simples los cuales pueden entrar al micelio a través de la membrana y promover la actividad metabólica del hongo.

2 JUSTIFICACIÓN

Los hongos han demostrado ser efectivos en la biodegradación de HAP de alto peso molecular como el BaP. Sin embargo, los estudios de biodegradación con hongos se han realizado en su mayoría con bajas concentraciones de BaP, en presencia de otra fuente de carbono y en cultivo líquido, aun y cuando se sabe que los hongos filamentosos están bien adaptados para crecer en ambientes terrestres, haciéndolos por tal razón atractivos para la biorremediación de suelos. El estudio de la biodegradación de BaP en suelos es difícil debido a la gran cantidad de variables involucradas en el proceso. Por otro lado, ha sido reportado que los hongos filamentosos, en especial los hongos ligninolíticos, habiendo biodegradado altos niveles de BaP en ensayos de laboratorio no presenta el mismo comportamiento al ser introducido a un suelo (May y col., 1997).

Los estudios hasta ahora reportados, sobre biodegradación de BaP en cultivo sólido se han realizado con concentraciones iniciales máximas de $0.5 \text{ mg BaP g}^{-1}$, sin embargo, existen reportes sobre la presencia de concentraciones hasta de $1.1 \text{ mg BaP g}^{-1}$ en matrices sólidas naturales (Paine y col., 1996), por lo que es importante el estudio de la biodegradación de BaP con concentraciones mas altas. Por otro lado, varios autores han reportado, que para que el BaP sea biodegradado por hongos filamentosos es necesaria la presencia de una fuente de carbono y energía de fácil asimilación (Cerniglia, 1992; Capotorti y col., 2004), por lo que los reportes sobre la biodegradación de BaP como única fuente de carbono por hongos son escasos.

A partir de lo anterior, surge la importancia de estudiar la biodegradación de BaP como única fuente de carbono por hongos filamentosos en sistemas modelo sólidos, que eliminen la complejidad de los ambientes naturales y permitan la realización de investigación básica como herramientas para la comprensión de los mecanismos de biodegradación del BaP.

Debido a que la biodegradación de BaP ha sido estudiado preferentemente en sistemas líquidos, es importante realizar estudios en este tipo de sistemas a fin de comparar los resultados con los obtenidos en cultivos sólidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la capacidad de *Aspergillus terreus* para biodegradar altas concentraciones de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía en un sistema modelo en cultivo sólido.

3.2 Objetivos Particulares

Comparar la capacidad de *Aspergillus terreus* con la capacidad de otros hongos filamentosos para biodegradar altas concentraciones de benzo(a)pireno en cultivo sólido bajo distintas condiciones nutricionales.

Seleccionar un soporte que permita estudiar la biodegradación de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía por *Aspergillus terreus*.

Evaluar la actividad deshidrogenasa de *Aspergillus terreus* y su relación con la biodegradación de benzo(a)pireno en cultivo líquido.

Evaluar la actividad deshidrogenasa de *Aspergillus terreus* y su relación con la biodegradación de los compuestos hidrosolubles derivados del metabolismo de benzo(a)pireno en cultivo sólido y cultivo líquido.

4 HIPOTESIS

La biodegradación de altas concentraciones benzo(a)pireno por los hongos filamentosos en cultivo sólido, es independiente de la presencia de otra fuente de carbono y energía de más fácil asimilación en el medio de cultivo.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos

Las cepas utilizadas se seleccionaron de acuerdo a reportes previos referentes a su capacidad de degradación de hidrocarburos (Volke-Sepúlveda, 2003; Peralta-Pérez, 2001; Díaz-Ramírez, 2000). *Aspergillus niger* ATCC 9642 y *Phanerochaete chrysosporium* H-298, cepas reportadas como degradadoras de hexadecano y fenantreno, respectivamente, fueron adquiridas de la colección de la Planta Piloto de Fermentación Sólida de la UAM-I. La cepa de *Aspergillus terreus* fue aislada previamente en el Laboratorio de Residuos Sólidos de la UAM-I, a partir de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam, planta localizada en un sitio contaminado con hidrocarburos (Díaz-Ramírez y col., 2003) e identificada por Microbial ID (Newark, Del) con base en una descripción microscópica.

5.2 Preparación de inóculo

Los hongos se propagaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Agar Papa-Dextrosa (PDA), inoculados por estría e incubados a 30 °C durante 8 días. Las esporas se cosecharon con 50 mL de una solución de Tween 80 (0.05%) con agitación suave con un agitador magnético. El contenido de esporas en la suspensión resultante se cuantificó en cámara de Neubauer.

Las botellas utilizadas en los ensayos de biodegradación se inocularon con la suspensión de esporas, para obtener una concentración final de 2×10^7 esporas (g soporte seco)⁻¹ en cultivo sólido o de 2×10^7 esporas mL⁻¹ en cultivo líquido.

Las cepas se conservaron a -4 °C en una solución de glicerol (15% v/v) en criotubos de 1.5 mL, en cada criotubo se colocaron 3 cuadros de 0.5 cm² de agar (PDA) inoculado por estría 8 días antes.

5.3 Medios de cultivo y soluciones de BaP

La composición de los medios de cultivo utilizados para cada una de las condiciones ensayadas se presenta en la Tabla 5.1. Los ensayos de biodegradación de BaP, en cultivo sólido y en cultivo líquido, se llevaron a cabo en presencia y en ausencia de glucosa. La relación C/N se ajustó por medio de la concentración de nitrógeno soluble (NaNO_3) en el medio de cultivo. En los ensayos donde se adicionó extracto de levadura, el aporte de carbono correspondió al 5% del carbono total, determinado a partir del análisis de carbono orgánico soluble total de una solución del extracto (50.5% de carbono).

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.5 con una solución de HCl 1N y posteriormente los matraces se aforaron con agua destilada y se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos.

A los medios de cultivo se les adicionó 2 mL L⁻¹ de la siguiente solución de oligoelementos (% p/v): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.015), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.161) y $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.008)

Los experimentos de biodegradación de BaP en ambos tipos de cultivo se realizaron en botellas serológicas de 120 mL. El BaP se agregó a cada botella serológica disuelto en diclorometano (DCM). Para cada cultivo el BaP se adicionó de diferente forma, en las secciones 5.4 y 5.5 se explican los procedimientos. Se prepararon diferentes soluciones estándar de BaP para obtener las concentraciones deseadas en cada uno de los experimentos. El BaP utilizado tenía un mínimo de pureza del 98% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo). En el Apéndice I y en el Apéndice II se presentan las hojas de datos de seguridad del BaP y del DCM, respectivamente.

Tabla 5.1 Composición de los distintos medios de cultivo

Condición	BaP ^a	Glucosa ^b	NaNO ₃ (g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	KCl (g L ⁻¹)	MgSO ₄ (g L ⁻¹)	Ext lev (g L ⁻¹)
Sólido (EPU)							
C/N 5	0.5	-	0.607	0.138	0.011	0.081	0.047
C/N 15	0.5	22.6	4.047	2.764	0.221	1.61	0.950
C/N 15	0.5	-	0.202	0.138	0.011	0.081	0.047
C/N 15	0.5	-	0.193	0.132	0.011	0.077	-
C/N 15	5.0	-	2.024	1.382	0.110	0.807	0.476
C/N 15	5.0	-	1.927	1.316	0.105	0.769	-
C/N 30	0.5	-	0.101	0.138	0.011	0.081	0.047
Sólido (agrolita)							
C/N 15	5.0	50.0	10.023	6.845	0.553	3.997	-
C/N 15	5.0	-	1.927	1.316	0.106	0.769	-
Líquido							
C/N 15	0.5	5.0	1.00	0.685	0.055	0.399	-
C/N 15	0.5	-	0.193	0.132	0.011	0.077	-

^a [mg BaP (g soporte seco)⁻¹] en medio sólido y [mg BaP mL⁻¹] en medio líquido

^b [mg glucosa (g soporte seco)⁻¹] en medio sólido y [mg glucosa mL⁻¹] en medio líquido

5.4 Cultivo sólido

5.4.1 Espuma de poliuretano

Condiciones de cultivo: El poliuretano utilizado para los ensayos de biodegradación de BaP se molió en un pulverizador de plásticos (Brabender 880804), se lavó tres veces con agua destilada a una temperatura cercana a la de ebullición, se secó a 60 °C durante una noche y finalmente se tamizó y se utilizó la fracción de tamaño de partícula menor a 0.4 mm.

Para todas las condiciones ensayadas en cultivo sólido con EPU se utilizaron botellas serológicas con 2 g de EPU, a los cuales se les agregó 1 mL de la solución estándar de BaP correspondiente, la espuma se homogeneizó con una varilla de vidrio, después las botellas permanecieron abiertas durante dos horas en la campana de extracción. Una vez evaporado el solvente se adicionaron 8 mL del medio de cultivo correspondiente a las condiciones de cada ensayo (Tabla 5.1) y se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos. Se inocularon con 2×10^7 esp g⁻¹ y se incubaron a 30 °C en una incubadora InnOva[®] 4200 (New Brunswick Scientific). Todos los ensayos se realizaron por triplicado con controles abióticos, controles negativos sin BaP y controles positivos con glucosa como única fuente de carbono.

Los ensayos de biodegradación con 0.5 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ con *A. terreus*, *A. niger* y *P. chrysosporium* en presencia y ausencia de glucosa, así como los realizados para observar el efecto de la relación C/N se llevaron a cabo durante 15 días de incubación. En estos ensayos las botellas serológicas fueron cerradas con tapones de algodón para permitir el intercambio gaseoso. Los análisis cuantitativos de biodegradación de BaP se realizaron al tiempo final del cultivo.

El efecto de la presencia del extracto de levadura en la biodegradación de 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ se estudió únicamente con *A. terreus*, los análisis cuantitativos de la biodegradación de BaP, producción de biomasa y carbono soluble se realizaron después de 7 días de incubación. Las botellas fueron selladas con tapones de neopreno para evitar el intercambio gaseoso y para cuantificar el CO₂ en varios tiempos durante la incubación.

Los ensayos de biodegradación de 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en ausencia de extracto de levadura por *A. terreus*, se llevaron a cabo durante 11 días. Se tomaron muestras para la cuantificación de BaP, biomasa, carbono soluble y CO₂, a diversos tiempos durante la incubación. En cada tiempo se sacrificaron tres botellas serológicas.

Extracción de BaP y carbono soluble: La extracción de glucosa y minerales residuales, así como del carbono soluble de la EPU se realizó por medio de dos lavados con 25 mL de agua destilada (cada lavado) y agitación manual intensa con la

espátula durante 30 segundos. La fase acuosa se obtuvo por filtración al vacío con un papel filtro Whatman[®] 42. La extracción del BaP se realizó con dos lavados del EPU con 25 mL de DCM (cada lavado) con agitación manual intensa durante 30 segundos. La fase orgánica se obtuvo por filtración al vacío con un filtro Whatman[®] 42 recuperándose en matraces. El solvente fue evaporado al vacío en un equipo Büchi[®] Rotavapor R-205 para obtener una solución concentrada, a partir de esta solución se realizó la cuantificación de BaP (eficiencia de extracción del 89%). Debido a la baja volatilidad del BaP no se obtuvieron pérdidas durante la evaporación del solvente.

5.4.2 Agrolita

Condiciones de cultivo: La agrolita se tamizó a un tamaño de partícula entre 1.19 y 1.68 mm, se lavó tres veces con agua destilada hirviendo y se secó a 60 °C durante una noche. En las botellas serológicas se colocaron 2 g de agrolita y 3.84 mL de medio de cultivo correspondiente a las condiciones de cada cultivo (Tabla 5.1) y posteriormente se añadió 0.5 mL de solución estándar de 20.0 mg BaP mL⁻¹, se homogeneizó con una varilla de vidrio y se evaporó el DCM durante dos horas en la campana de extracción. Las botellas se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos, se inocularon con 2×10^7 esp g⁻¹ y se incubaron a 30 °C durante 72 horas en una incubadora InnOva[®] 4200 (New Brunswick Scientific). Los ensayos se realizaron por triplicado con controles abióticos, controles negativos sin BaP y controles positivos con glucosa como única fuente de carbono.

Extracción de BaP y carbono soluble: La glucosa, minerales residuales y el carbono soluble se extrajeron mediante el mismo procedimiento utilizado para su extracción en los cultivos sólidos con EPU. Debido a la porosidad de la agrolita, la extracción del BaP se realizó por Soxhlet con 160 mL de DCM durante dos horas. El solvente de la fase orgánica se evaporó al vacío en un equipo Büchi[®] Rotavapor R-205 para obtener una solución concentrada, a partir de la cual se realizó la cuantificación de BaP (eficiencia de extracción del 97.5%).

5.5 Cultivo líquido

Condiciones de cultivo: Se adicionaron 0.5 mL de solución estándar de 25 mg BaP mL⁻¹ a las botellas serológicas; éstas permanecieron abiertas durante dos horas en la campana de extracción. Se agregaron 50 mL de medio de cultivo de acuerdo a la condición estudiada (Tabla 5.1), se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos. Las botellas se inocularon con 2×10^7 esp mL⁻¹ y se incubaron a 30 °C con agitación a 150 rpm durante 72 horas en una incubadora InnOva[®] 4200 (New Brunswick Scientific). Los ensayos se realizaron por triplicado con controles abióticos, controles negativos sin BaP y controles positivos con glucosa como única fuente de carbono.

Extracción de BaP y carbono soluble: La extracción del BaP se realizó por extracción líquido-líquido con 25 mL de DCM en un embudo de separación, después de fuerte agitación la fase acuosa se separó de la fase orgánica a la cual se le realizó una segunda extracción con otros 25 mL de DCM. La fase acuosa se filtró al vacío con un papel de celulosa Whatman[®] 42, la biomasa se recuperó y resuspendió en 10 mL de DCM. El BaP adherido a la biomasa se separó por sonicación en DCM durante dos minutos. La fase orgánica se evaporó al vacío en un equipo Büchi[®] Rotavapor R-205 para obtener una solución concentrada de BaP a partir de la cual se cuantificó el BaP (eficiencia de extracción del 96%).

5.6 Biodegradación de carbono soluble

Este ensayo se realizó con todos los extractos acuosos provenientes de los cultivos sólidos (EPU y agrolita) y del cultivo líquido en ausencia de glucosa. Para los experimentos a partir de los cultivos con EPU, se utilizaron los extractos de los cultivos con 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ con y sin extracto de levadura. En matraces Erlenmeyer de 50 mL se colocaron 6 mL del extracto correspondiente, los

matraces se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos y se inocularon con 2×10^7 esp mL⁻¹; se incubaron a 30 °C con agitación de 150 rpm durante 72 horas en una incubadora InnOva[®] 4200 (New Brunswick Scientific). Al finalizar el periodo de incubación se cuantificó el carbono soluble y se midió la biomasa por peso seco. Los ensayos se realizaron por triplicado.

5.7 Actividad deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa de *A. terreus* se estudió para los extractos acuosos y diferentes concentraciones de BaP (1, 10, 25, 50, 120, 180, 250, 500, 1000, 2500 y 5000 mg L⁻¹). Se utilizaron microplatos estériles de 96 pozos de 300 mL con fondo cóncavo (Corning Incorporated Costar[®] 3790). En cada pozo se colocaron 30 µL de la solución estándar de BaP en DCM correspondiente para cada concentración, una vez que el DCM se evaporó se agregaron 200 µL de medio de cultivo (manteniendo una relación C/N de 15 para cada concentración), 50 µL de amortiguador Tris (40 mM) a pH 6 y 10 µL del reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche[®] Diagnostic Corporation). En el caso de los extractos acuosos no se agregó la solución estándar de BaP y el medio de cultivo fue sustituido por 200 µL de cada extracto. Cada pozo se inoculó con 2×10^7 esp mL⁻¹ y se incubó a 30 °C en un lector de microplatos (Ultramicroplate reader ELx808_{IU}[®] BIO-TEK Instruments, Inc) en el cual se midió la densidad óptica (DO) a 450 nm con una longitud de onda de referencia a 595 nm, en periodos de 2 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada concentración de BaP y por sextuplicado para cada extracto. Se realizaron controles abióticos y controles con DCM en ausencia de BaP. Este método fue adaptado de lo reportado por Johnsen y col. (2002).

5.8 Métodos analíticos

5.8.1 Determinación de BaP

La cuantificación de BaP en las fases orgánicas se realizó por HPLC con una fase móvil de acetonitrilo:agua (90:10), con un flujo de 2 mL min⁻¹ y con una columna Spherisorb ODS2 de 15 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 5 µm de espesor de película. El BaP fue detectado con un detector de longitud de onda variable (Termo Separation Products Spectromonitor[®] 4100) operando a 254 nm.

5.8.2 Determinación de CO₂

El CO₂ producido en los experimentos en cultivo sólido (EPU), así como el consumo de O₂, se cuantificaron por cromatografía de gases (GOW-MAC 580) utilizando una columna CTR1 (Alltech) a 50 °C, con un flujo de 40 mL min⁻¹ de helio como gas acarreador, el detector de conductividad térmica y el inyector se mantuvieron a 80 °C. Se inyectaron 100 µL de cada muestra, las cuales se obtuvieron del espacio libre de las botellas serológicas. El análisis cromatográfico de mezclas de CO₂, O₂ y N₂ de concentraciones conocidas permitió la obtención de el contenido (%) de estos compuestos en las muestras. Los valores obtenidos en porcentaje de CO₂ se convirtieron a moles utilizando la ley de los gases ideales.

Para los ensayos de biodegradación de BaP en cultivo sólido con agrolita y en cultivo líquido, se siguió el mismo método descrito en la secciones 5.2.2 y 5.3, respectivamente, con la diferencia que se usaron botellas Wheaton[®] de 500 mL con 4 g de agrolita y 7.7 mL de medio mineral para el cultivo sólido y 50 mL de medio mineral para el cultivo líquido. La cuantificación de CO₂ y O₂ se realizó en línea a partir de las botellas conectadas a un respirómetro Micro-Oxymax System (Columbus Instruments). La cuantificación se realizó cada 6 horas con recambio de atmósfera cada 12 horas.

5.8.3 Mineralización de BaP

De acuerdo al método de determinación de la biodegradabilidad de compuestos orgánicos (OCDE C.4-C), a través de la producción del CO₂, la mineralización se define como la relación entre el CO₂ producido por acción biológica, respecto al CO₂ teórico producido (asumiendo que el compuesto es oxidado completamente hasta CO₂) (Pagga, 1997). Por lo tanto la mineralización (m%) se determinó utilizando la Ecuación 5.1.

$$m (\%) = \left(\frac{\text{CO}_2 \text{ producido}}{\text{CO}_2 \text{ teórico}} \right) \left(100 \right) \quad \text{Ec. 5.1}$$

CO₂ producido: obtenido experimentalmente (mmol CO₂)

CO₂ teórico: calculado a partir del carbono inicial de BaP (mmol CO₂)

5.8.4 Determinación de glucosa

La glucosa residual en los cultivos se cuantificó por el método enzimático colorimétrico GOD-PAP, Spireact[®] basado en el método de Trinder (1964).

En tubos de ensaye, se colocaron 20 µL de muestra o estándar y 2 mL de reactivo (enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa), éstos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se leyeron a una longitud de onda de 505 nm. Como blanco se utilizó agua destilada a la que se le aplicó el mismo procedimiento, el estándar utilizado fue una solución de glucosa (1 mg mL⁻¹).

5.8.5 Determinación de carbono soluble

El carbono soluble en la fase acuosa de los cultivos se detectó como carbono orgánico total (TOC, por sus siglas en ingles) en un TOC-5000A Shimadzu[®]. En tubos de ensayo de 9 mL se colocó 1 mL de la muestra y 2 mL de agua destilada. Las muestras y el agua destilada fueron filtradas con filtros de nylon con tamaño de poro de 0.45 µm (Millez[®]-HN Millipore). Para eliminar el CO₂ soluble en agua, todas

las muestras se acidificaron con 0.3 mL de una solución 1 N de HCl y fueron burbujeadas con aire por 3 minutos.

En este trabajo, el carbono soluble también será referido como compuestos hidrosolubles o metabolitos hidrosolubles.

5.8.6 Determinación de biomasa

La biomasa en los cultivos sólidos se estimó a través de la cuantificación de proteínas por medio del método de Lowry y col. (1951), utilizando los reactivos comerciales de BIO-RAD DC Protein Assay Kit[®] y biomasa seca como estándar.

Para la obtención de proteína, se hidrolizaron 0.5 g de muestra de cultivo sólido en EPU (posterior a la extracción del BaP) por calentamiento en 10 mL de solución de NaOH 0.5 N durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo. Para las muestras de los cultivos en agrolita se realizó lo mismo, excepto que la agrolita fue pulverizada después de la extracción de BaP, para evitar que ésta flotara durante la hidrólisis, debido al aire contenido en los poros.

Después de la hidrólisis se tomaron 200 μ L de muestra, se agregaron 100 μ L de reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y 800 μ L de reactivo B (reactivo Folin diluido), se agitaron e incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se leyó a una longitud de onda de 750 nm, utilizando como blanco agua tratada bajo las mismas condiciones que las muestras.

La estimación de la biomasa se realizó mediante curvas de calibración obtenidas con concentraciones conocidas de biomasa de *A. terreus* a la cuales se les realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente. La biomasa obtenida a partir de cultivos líquidos en presencia de glucosa (20 g L⁻¹) se utilizó seca y pulverizada,.

La biomasa producida en los cultivos líquidos fue cuantificada mediante la técnica de peso seco, filtrando al vacío con papel filtro Whatman[®] 42 previamente a peso constante, los filtros se secaron a 60 °C, se enfriaron en un contenedor libre de humedad y se pesaron al final de este proceso.

5.9 Obtención de tasas de consumo y producción

Las tasas de consumo de BaP y producción de CO₂, biomasa y carbono soluble, se obtuvieron mediante la evolución de la primera derivada de un polinomio ajustado a las cinéticas. En algunos casos las tasas fueron obtenidas mediante la linearización de la fase exponencial de las cinéticas. Los experimentos en donde esto se realizó se menciona en el texto en Resultados y discusión.

5.10 Análisis estadístico

El análisis de datos se llevó a cabo mediante análisis paramétricos. Para experimento se realizaron análisis de varianza de medias (GLM-ANOVA) que permitió el estudio de efectos individuales de varios factores en un solo experimento así como el estudio de las interacciones entre experimentos. Para controlar la posibilidad de error global del experimento se realizaron también análisis de comparación múltiple Tukey-Kramer. Ambos análisis se realizaron en el paquete estadístico NCSS97.

En las tablas de resultados reportadas en la Sección de Resultados y discusión, el análisis de varianza entre datos de una misma columna se encuentra representado con letras mayúsculas para la comparación de los datos en una misma columna, mientras que la comparación entre los datos de un mismo renglón con letras minúsculas. En las gráficas de resultados se reporta la desviación estándar de las repeticiones representada en barras de error.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo se divide en dos partes. En la primera se presenta la biodegradación de BaP por tres hongos filamentosos y en la segunda, la biodegradación de BaP por *A. terreus* en distintas condiciones de cultivo.

6.1 Biodegradación de benzo(a)pireno por hongos filamentosos en espuma de poliuretano

Este experimento se diseñó con la finalidad de evaluar la capacidad de biodegradación de BaP ($0.5 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$) de tres hongos filamentosos, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* y *Phanerochaete chrysosporium*, en cultivo sólido bajo diferentes condiciones nutricionales y con EPU como soporte.

6.1.1 Efecto de la glucosa en la biodegradación de BaP

En la Tabla 6.1 se presentan los resultados de biodegradación de BaP para los experimentos en EPU con $0.5 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$, por *A. terreus*, *A. niger* y *P. chrysosporium* después de 15 días de incubación en ausencia de glucosa (resultados denominados “BaP”) y en presencia de $22.6 \text{ mg glucosa (g soporte seco)}^{-1}$ (resultados denominados “Glu+BaP”). En presencia de glucosa, *P. chrysosporium* presentó el mayor nivel de biodegradación (60.6%), seguido por *A. niger* (54.4%) y *A. terreus* (56.0%) que no presentaron diferencias significativas entre ellos.

Tabla 6.1 Biodegradación de BaP en presencia y ausencia de glucosa en cultivos sólidos (EPU) y 0.5 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ iniciales después de 15 días de cultivo

Cepa	BaP biodegradado (mg (g soporte seco) ⁻¹)	
	Glu + BaP ^a	BaP ^a
<i>A. terreus</i>	0.280 ± 0.019 Aa	0.377 ± 0.004 Ab
<i>A. niger</i>	0.272 ± 0.011 Aa	0.175 ± 0.023 Bb
<i>P. chrysosporium</i>	0.303 ± 0.009 Ba	0.314 ± 0.011 Ca

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas y minúsculas para renglones

Varios estudios han demostrado que el BaP no puede ser utilizado como única fuente de carbono y energía, así que el medio de cultivo debe ser suplementado con una fuente de carbono, que sea transformada en biomasa y que induzca la producción de enzimas catabólicas (Cerniglia, 1992; Providenti y col., 1993). Esto se pudo observar en los cultivos con *A. niger*, en donde la biodegradación de BaP fue mayor en presencia de glucosa, incrementándose 1.5 veces con respecto a los cultivos en ausencia de este azúcar (Tabla 6.1), sugiriendo que probablemente el aumento en la biomasa, como resultado del consumo del azúcar, favoreció la biodegradación. El caso contrario se observó para *A. terreus* en donde la biodegradación de BaP disminuyó 1.3 veces en presencia de glucosa (Tabla 6.1), mientras que para *P. chrysosporium* no se observó un efecto significativo de la presencia de glucosa en el medio sobre la biodegradación del BaP.

Los valores de biodegradación de BaP encontrados para *P. chrysosporium*, tanto en presencia como en ausencia de glucosa, son elevados con respecto a los encontrados en la literatura. Dzul-Puc y col. (2005), reportaron que *P. chrysosporium* CDBB-H298 biodegradó 0.051 y 0.037 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en suelo con aserrín de pino y suelo con bagazo de caña, respectivamente, en presencia de 0.50 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ durante 20 días. Por otro lado, Rodríguez-Vázquez y col. (1999), encontraron que *P. chrysosporium* CDBB-H298 degradó 0.22 mg BaP (g soporte seco)⁻¹, en un sistema de suelo con bagazo de caña y 0.50 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ después de 18 días.

De forma similar a lo ocurrido en nuestro estudio, en donde la glucosa no tuvo efecto alguno sobre la biodegradación de BaP por *P. chrysosporium*, Tekere y col. (2005), encontraron que la presencia de glucosa en el medio de cultivo no mejoró la biodegradación de pireno y benzo(a)antraceno (0.02 mg mL^{-1}) por una cepa de *P. chrysosporium*, sin embargo, encontraron un aumento en los niveles de degradación de estos dos HAP al agregar glucosa en los cultivos con *Trametes versicolor* y *Trametes pocas*, después de 31 días.

Hasta el momento, no se conocen reportes sobre biodegradación de altas concentraciones de BaP como única fuente de carbono y energía, por hongos no basidiomicetos en cultivos sólidos. Sin embargo, existen reportes sobre la capacidad de estos hongos para degradar bajas concentraciones de HAP de alto peso molecular como el pireno y el BaP (Launen y col., 1995; Potin y col., 2004). Launen y col. (1995), reportaron varias cepas de los géneros *Penicillium*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma* y *Mucor* con la capacidad de degradar pireno y BaP (0.10 mg mL^{-1}). Potin y col. (2004), reportaron que *Fusarium* sp. y *Coniothyrium* sp. biodegradaron 0.068 y $0.071 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$, respectivamente, en un cultivo con suelo intemperizado con una concentración inicial de BaP de $0.134 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ en presencia de glucosa y sacarosa ($5.00 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$). *Fusarium solani* y *Trichoderma viride* biodegradan el 58 y 50%, respectivamente, de una concentración inicial de $0.10 \text{ mg BaP mL}^{-1}$ en presencia de $10 \text{ mg glucosa mL}^{-1}$ después de 30 días de incubación (Verdin y col., 2004).

En este estudio, se encontró que *A. terreus* y *P. chrysosporium* biodegradaron una mayor cantidad de BaP en ausencia y presencia de glucosa, es decir, tanto los hongos ligninolíticos como los no ligninolíticos pueden ser utilizados para la biodegradación de este compuesto. Colombo y col. (1996), realizaron un estudio en el cual tres cepas de hongos basidiomicetos (*Pleurotus ostreatus*, *Trametes villosa* y *Coriolopsis rigida*) y cuatro de no basidiomicetos (*Penicillium chrysogenum*, *A. terreus*, *F. solani* y *Trichoderma harzianum*), fueron inoculados por separado en un suelo contaminado con $0.10 \text{ mg HAP (g soporte seco)}^{-1}$, demostrando que no existieron diferencias significativas entre los niveles de biodegradación de acuerdo al

grupo taxonómico, observándose las mayores degradaciones ($0.07 \text{ mg HAP (g soporte seco)}^{-1}$) por *F. solani* y *C. rigida*, después de 15 días de cultivo. De la misma forma, se ha reportado que no existen diferencias significativas entre la capacidad degradadora de BaP por varias cepas de *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* y *Aspergillus ochraceus*, bajo las mismas condiciones de cultivo después de 17 días de cultivo; en el mismo estudio se encontró que las cepas de *P. chrysosporium* biodegradan 10 veces más BaP que una cepa de *A. niger* (Wunch y col., 1997).

Una vez observado que *A. terreus*, *A. niger* y *P. chrysosporium* biodegradaron BaP en ausencia de glucosa y debido a que el nitrógeno es un macronutriente importante requerido para la actividad microbiana en presencia de HAP (Liebeg y Cutright, 1999), se diseñó un experimento para evaluar el efecto de la concentración de nitrógeno disuelto, en donde se estudió la biodegradación de $0.50 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ por los tres hongos filamentosos, a tres diferentes relaciones carbono nitrógeno (C/N).

6.1.2 Efecto de la relación C/N en la biodegradación de BaP

En la Figura 6.1 se muestra la biodegradación de BaP en EPU con $0.5 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ por *A. terreus*, *A. niger* y *P. chrysosporium*, en ausencia de glucosa, bajo relaciones C/N de 5, 15, y 30, después de 15 días de cultivo. Se encontraron diferencias significativas en la biodegradación de BaP para cada hongo. No se observó efecto significativo de la relación C/N sobre la biodegradación de BaP en los cultivos de *A. niger* y *P. chrysosporium*. Mientras que para los cultivos de *A. terreus* se observaron diferencias significativas entre las relaciones C/N probadas: con C/N 5 y 15 la biodegradación de BaP fue significativamente mayor con respecto a C/N 30. Por otro lado, se observó que en general, la mayor degradación de BaP es obtuvo con *A. terreus*, seguida por *P. chrysosporium* y finalmente por *A. niger*.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el efecto de la relación C/N sobre la biodegradación de BaP por *P. chrysosporium*, fueron similares a los reportados por Rodríguez-Vázquez y col. (1999), quienes encontraron que la degradación de BaP

por *P. chrysosporium*, en un cultivo con suelo y bagazo de caña y $0.5 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$, por lo que no se modificó al realizarse bajo condiciones de C/N 30 y 121. Por otro lado, observaron que para *P. ostreatus* y *T. versicolor* la degradación de BaP se incrementó al limitar el nitrógeno del medio (C/N de 121) favoreciendo así la producción de enzimas ligninolíticas.

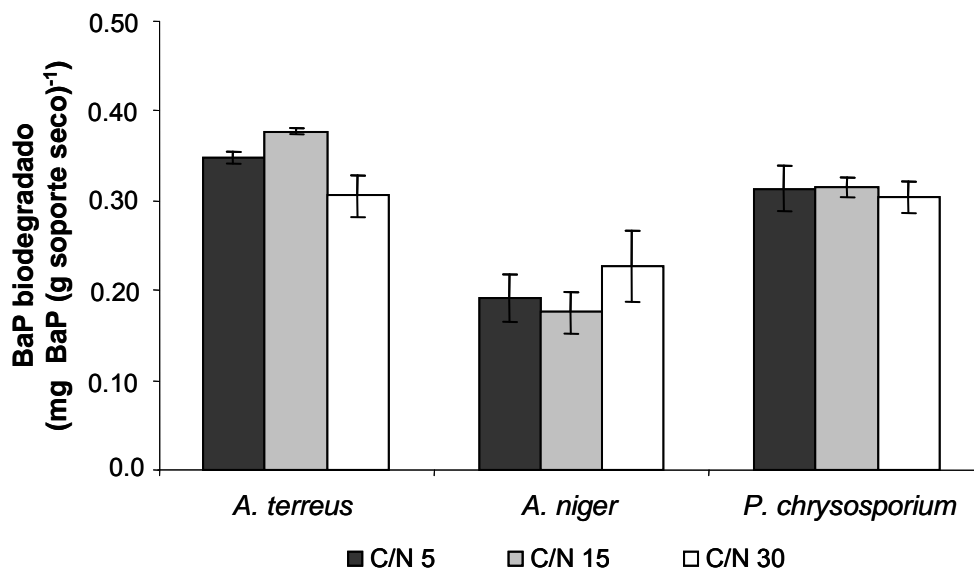


Figura 6.1 Biodegradación de BaP por *A. terreus*, *A. niger* y *P. chrysosporium* en cultivo sólido (EPU) con $0.5 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ después de 15 días de cultivo

La literatura refiere que para los hongos de pudrición blanca, la deficiencia de nitrógeno en el medio y la presencia de lignina favorece la producción de enzimas ligninolíticas (Kirk, 1980), que son las responsables de la biodegradación de los HAP en este tipo de hongos.

Debido a que en este trabajo las concentraciones de nitrógeno utilizadas en los distintos medios de cultivo no fueron lo suficientemente bajas, no se observó el efecto de la deficiencia de nitrógeno en la degradación de BaP por *P. chrysosporium*, sin embargo, si se encontraron niveles altos de degradación. Por otro lado, la concentración de carbono disuelto en el agua con respecto a la concentración de nitrógeno disuelto es baja, produciendo relaciones C/N pequeñas presentándose un exceso de nitrógeno en todos los casos.

Amezcuca-Allieri y col. (2003), reportaron que la degradación de fenantreno en suelo y bagazo de caña por *Penicillium frequentans* es dependiente de la relación C/N y de la humedad en el cultivo, encontrando la mayor degradación de fenantreno a C/N de 60 (8 mM de nitrógeno). Por otro lado, Kirk (1980), mencionaron que un cultivo con concentraciones bajas de nitrógeno (2 a 3 mM) contiene la concentración óptima para el metabolismo de los contaminantes. Estos resultados son consistentes con los resultados del presente trabajo para el caso *A. terreus*, en donde se encuentran los mayores niveles de degradación a C/N correspondientes a concentraciones de nitrógeno entre 5.7 y 1.5 mM.

Como se conoce, el nitrógeno es un macronutriente relacionado con la producción de proteínas, por otro lado, el BaP no es un sustrato asimilable, por lo que a partir de su oxidación no se puede producir biomasa (Cerniglia, 1992). Considerando lo anterior, probablemente para el caso de *A. niger*, la biodegradación de BaP produzca muy bajas concentraciones de biomasa, por lo que aún las bajas concentraciones de nitrógeno (C/N 30) no fueron un factor limitante. El caso contrario pudo haber sucedido para *A. terreus*, en donde la limitación de nitrógeno produce una disminución en la degradación de BaP, lo que sugiere que este hongo puede estar utilizando el carbono de BaP para la producción de una mayor cantidad de biomasa.

6.1.3 Conclusiones parciales

Los tres hongos filamentosos estudiados, *A. terreus*, *A. niger* y *P. chrysosporium*, fueron capaces de biodegradar BaP en cultivo sólido con EPU como soporte durante 15 días de incubación. Los máximos niveles de biodegradación se obtuvieron con *A. terreus* y *P. chrysosporium*.

La presencia de glucosa, así como las diferentes relaciones C/N probadas, produjeron diversos efectos sobre la biodegradación del BaP para cada uno de los hongos. Para *P. chrysosporium* ni la glucosa ni la concentración de nitrógeno modificaron la biodegradación de BaP. Para *A. niger* la concentración de nitrógeno no tuvo efecto alguno sobre la biodegradación del BaP, sin embargo, la presencia de

glucosa incrementó la biodegradación. La presencia de glucosa disminuyó la biodegradación de BaP por *A. terreus* y la mayor biodegradación de BaP se obtuvo con C/N de 5 y 15.

Debido a que *A. terreus* presentó los máximos niveles de biodegradación de BaP en ausencia de glucosa y a su sensibilidad a los cambios de C/N, se seleccionó esta cepa para realizar estudios sobre la biodegradación y mineralización de BaP, así como la formación de biomasa y compuestos hidrosolubles, con el objeto estudiar los mecanismos de biodegradación de BaP con *A. terreus* como hongo no ligninolítico modelo.

6.2 Biodegradación de benzo(a)pireno por *Aspergillus terreus* en espuma de poliuretano

Con la finalidad de estudiar la biodegradación de BaP como única fuente de carbono, se realizaron ensayos con y sin extracto de levadura como otra fuente de carbono, para evaluar su efecto sobre la biodegradación de BaP por *A. terreus*.

En esta sección se presentan los resultados de los ensayos de biodegradación de BaP por *A. terreus* en presencia y ausencia de extracto de levadura, con concentraciones iniciales de 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹. El efecto del extracto de levadura se evaluó mediante la cuantificación del BaP, biomasa y carbono soluble al final del cultivo, así como con la producción de CO₂. También se presentan las cinéticas de biodegradación de BaP y producción de biomasa, carbono soluble y CO₂ en cultivos en ausencia de extracto de levadura.

6.2.1 Producción de biomasa y carbono soluble

En la Tabla 6.2 se presenta la producción de biomasa y carbono soluble en presencia y ausencia de extracto de levadura con 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹, en cultivo sólido (EPU) después de 7 días de incubación. Se observó que al

augmentar la concentración inicial de BaP se incrementó la producción de biomasa en un orden de magnitud. Por otro lado, la presencia de extracto de levadura a las concentraciones utilizadas (0.047 y $0.476 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$), no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento celular adicionadas al medio de cultivo. Es importante mencionar que posiblemente debido a las altas desviaciones estándar encontradas, no se observó el efecto de este sustrato sobre la producción de biomasa.

Tabla 6.2 Producción de biomasa y carbono soluble en ausencia y presencia de extracto de levadura con concentraciones iniciales de 0.5 y $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ en cultivo sólido (EPU) después de 7 días de cultivo

<i>Condición de cultivo</i>	<i>Biomasa^a (mg g⁻¹)</i>	<i>Carbono soluble^a (mg g⁻¹)</i>
<u>Sin extracto de levadura</u>		
$0.5 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$	$0.044 \pm 0.009 \text{ A}$	$0.027 \pm 0.004 \text{ A}$
$5.0 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$	$0.561 \pm 0.148 \text{ B}$	$0.662 \pm 0.057 \text{ B}$
<u>Con extracto de levadura</u>		
$0.5 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$	$0.064 \pm 0.015 \text{ A}$	$0.040 \pm 0.013 \text{ A}$
$5.0 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$	$0.784 \pm 0.410 \text{ B}$	$0.728 \pm 0.070 \text{ B}$

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

Similar a lo reportado por Bouchez y col. (1996), en este trabajo se consideró que el carbono soluble detectado en los medios de cultivo, corresponde a metabolitos solubles en agua producidos durante la oxidación parcial de BaP. En la Tabla 6.2 se presentan las concentraciones de carbono soluble encontradas en la fase acuosa, provenientes de los cultivos en presencia y ausencia de extracto de levadura, con 0.5 y $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$. La producción de carbono soluble no se favoreció por la presencia de extracto de levadura, indicando que el carbono soluble detectado corresponde a carbono proveniente de la oxidación del BaP. El aumento en la concentración inicial de BaP genera un incremento en la concentración del carbono

soluble, sugiriendo la acumulación de metabolitos derivados del BaP que no pueden ser biodegradados.

La cinética de producción de biomasa y de carbono soluble en el medio de cultivo con $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ en ausencia de extracto de levadura se presenta en la Figura 6.2.

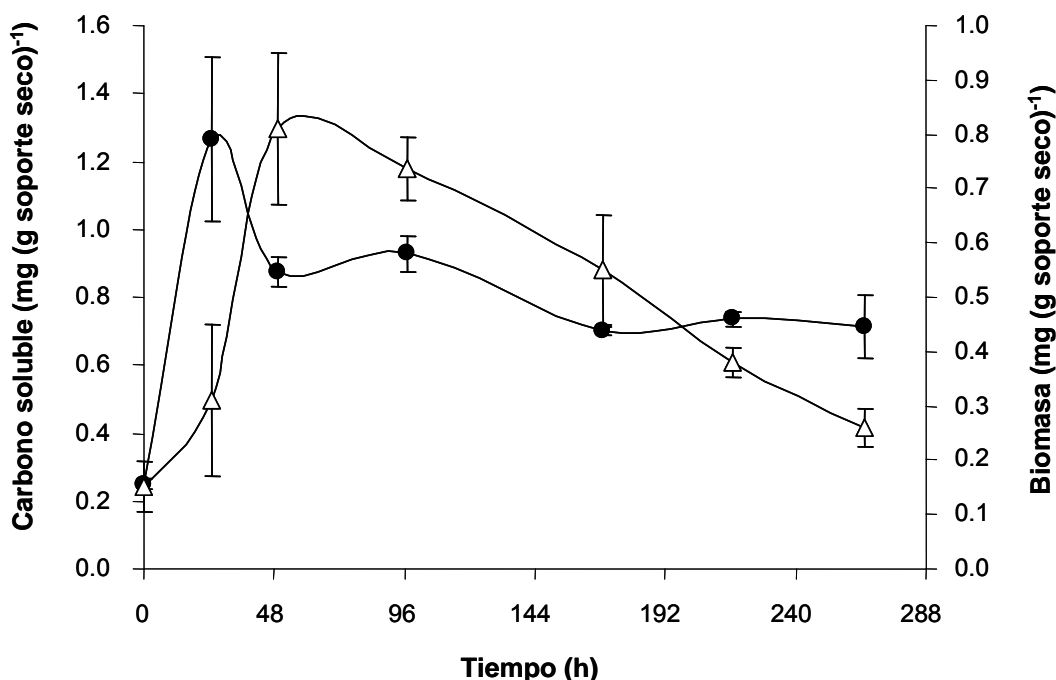


Figura 6.2 Cinética de producción de biomasa (triángulos) y carbono soluble (círculos) generados durante la biodegradación de BaP por *A. terreus* en cultivo sólido (EPU) con $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ en ausencia de extracto de levadura

La tasa de producción de biomasa durante las primeras 25 horas de cultivo fue de $6.36 \times 10^{-3} \text{ mg (g soporte seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La producción de biomasa se incrementó durante las siguientes 24 horas a una tasa de $2.09 \times 10^{-2} \text{ mg (g soporte seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, obteniéndose en este periodo la máxima producción ($0.812 \pm 0.14 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$). El periodo de máxima producción de biomasa corresponde al intervalo en donde la concentración del carbono soluble disminuye, sugiriendo que el carbono de compuestos producidos por la oxidación parcial del BaP fue incorporado a la biomasa. Existen reportes sobre la incorporación de carbono proveniente de HAP

en la biomasa de hongos. Song (1999), reportó que después de 28 días de incubación en un medio líquido con 8.46 ng [4,5,9,10] ^{14}C -pireno mL^{-1} y enriquecido con extracto de levadura, extracto de malta y glucosa, el 40.2, 30.5 y 22.5 % del ^{14}C total se encontró en la biomasa de *P. chrysosporium*, *Irpex lacteus* y *T. versicolor*, respectivamente.

En el presente trabajo, a partir de 96 horas de cultivo, la concentración de biomasa disminuyó debido a la autólisis del hongo. Veignie y col. (2002), observaron una reducción en la biomasa de *F. solani* después de 150 horas de incubación en presencia de 0.188 mg BaP mL^{-1} y 10 mg glucosa mL^{-1} , la cual fue probablemente causada por el agotamiento de algún mineral, fuente de carbono, o por la acumulación de algún producto que inhibió el consumo de la fuente de carbono.

La máxima producción de carbono soluble se presentó durante las primeras 25 horas de cultivo, obteniéndose una tasa de producción de 0.041 mg C $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Posteriormente, se observó un consumo del carbono soluble, viéndose reflejado en el aumento de la producción de biomasa, después de las 49 h de cultivo la concentración de carbono soluble permaneció constante, lo que sugiere, que cierta proporción de los compuestos producidos por la oxidación parcial del BaP son consumidos y que hay productos que no son biodegradados, los cuales representan el 31.5% del C consumido, posiblemente esta es la razón por la que a partir de este tiempo la biomasa comienza a lisarse.

La permanencia de compuestos hidrosolubles en cultivos con HAP y hongos ha sido ampliamente estudiada. Romero y col. (2002), reportaron que en cultivos con *Cylindrocarpon didymum*, *F. solani* y *Penicillium variable* con 0.04 mg [4,5,9,10] ^{14}C -pireno mL^{-1} , en ausencia de glucosa y después de 17 días, observaron compuestos carbonados en la fase acuosa correspondiente al 33.3, 30 y 28.5% del ^{14}C total, respectivamente. En otro estudio, Song (1999), reportó que después de 28 días de incubación en un medio líquido con 8.46 ng [4,5,9,10] ^{14}C -pireno mL^{-1} y enriquecido con extracto de levadura, extracto de malta y glucosa, bajo las condiciones de cultivo, se observó una acumulación de ^{14}C total en las fases acuosas, siendo del 47% para *T. versicolor* KR11W, del 33.5% para *P. chrysosporium* y del 21% para *P. ostreatus*.

Posteriormente al análisis de producción de biomasa y carbono soluble a partir del BaP, se llevaron a cabo ensayos de biodegradación de BaP en presencia y ausencia de extracto de levadura en cultivo sólido con EPU, en los cuales se cuantificó la producción de CO₂.

6.2.2 Producción de CO₂

La presencia del extracto de levadura, no tuvo efecto significativo en la producción de CO₂ en cultivos sólidos con EPU, obteniéndose 1.61 ± 0.27 mg CO₂ (g soporte seco)⁻¹ en los cultivos con 0.5 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ y 2.74 ± 0.40 mg CO₂ (g soporte seco)⁻¹ con 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹, después de 7 días de cultivo.

Por otro lado, en los cultivos en ausencia de extracto de levadura y BaP se produjeron niveles de CO₂ similares a los encontrados para la cinética de biodegradación de 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en ausencia de extracto de levadura. En la Figura 6.3 se presenta una comparación entre estos dos cultivos.

En la Figura 6.3A se observa la producción de CO₂ a partir de los cultivos en medio sólido con EPU como soporte y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹. Durante las primeras 49 horas de cultivo se obtuvo la máxima producción de CO₂, con una tasa de producción de 0.056 ± 0.0006 mg (g soporte seco)⁻¹ h⁻¹ seguido por un periodo con menor tasa de producción. En los cultivos en presencia de BaP, la producción de CO₂ entre las 25 y 49 horas puede ser atribuida a la disminución de los compuestos hidrosolubles (Figura 6.2).

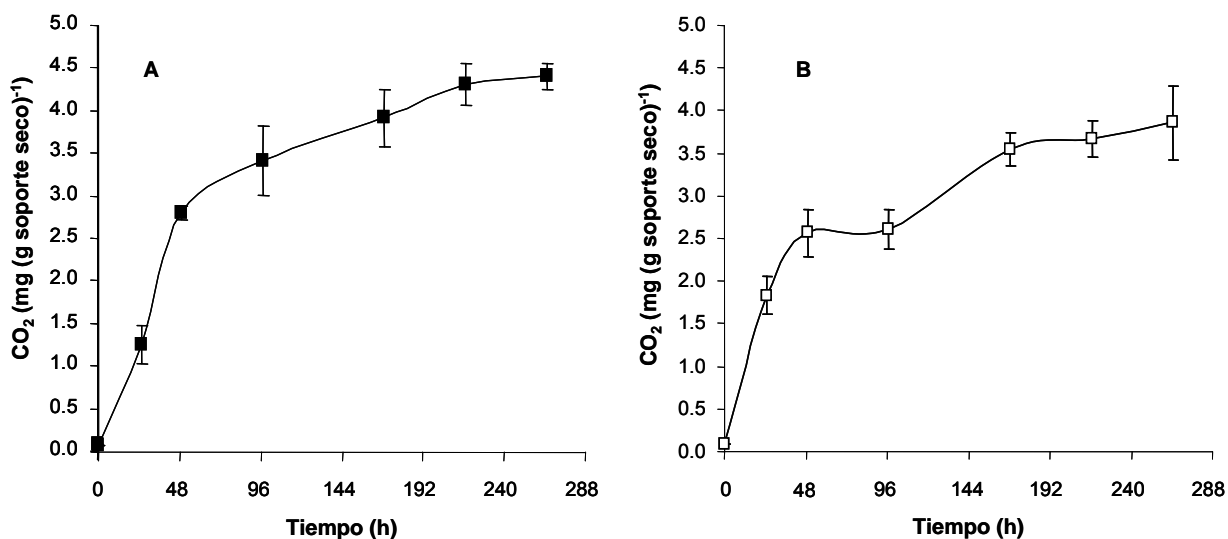


Figura 6.3 Cinética de producción de CO₂ en cultivos con *A. terreus* en EPU; A) en presencia de 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹; B) en ausencia de BaP

La mineralización de metabolitos polares producidos por la biodegradación del BaP por hongos ha sido reportada en la literatura. Boyle y col. (1998), encontraron que una cepa de *T. versicolor* inoculado en 2 g de suelo y 0.5 g de paja de alfalfa con 5 mL de medio mineral y 0.4 mg g⁻¹ de [7,9] ¹⁴C-BaP, produce metabolitos polares los cuales son mineralizados 6.7 veces más que el BaP en un período de 4 días de cultivo a 22 °C.

La producción de CO₂ durante las primeras 24 horas de cultivo se puede atribuir al consumo de BaP, lo cual es consistente con la máxima producción de compuestos hidrosolubles durante este periodo (Figura 6.2). La producción de CO₂ posterior a las 144 horas se atribuyó al consumo de la biomasa.

En la Figura 6.3B se presenta la cinética de producción de CO₂ producido a partir de los cultivos en ausencia de BaP. La producción de CO₂ sigue el mismo comportamiento encontrado para los cultivos en presencia de BaP, con una tasa de producción de 0.046 ± 0.001 mg CO₂ (g soporte seco)⁻¹ h⁻¹, la cual es significativamente menor a la encontrada en los cultivos en presencia de BaP, al final del cultivo se encuentran niveles de CO₂ similares a los presentados en presencia de BaP, por lo que se puede inferir que la espuma de poliuretano contiene compuestos

que son consumidos y mineralizados por *A. terreus* bajo las condiciones de cultivo estudiadas.

Para confirmar que la producción de CO₂ durante las primeras 24 horas de cultivo se debió a la biodegradación de BaP, se realizaron ensayos de biodegradación de BaP en cultivo sólido con EPU, en presencia y ausencia de extracto de levadura, los resultados se muestran a continuaci

6.2.3 Biodegradación de benzo(a)pireno

En la Tabla 6.3 se presenta la biodegradación de BaP en los diferentes cultivos, donde se compara el efecto de la adición del extracto de levadura y diferentes concentraciones iniciales de BaP.

Tabla 6.3 Biodegradación de BaP por *A. terreus* en ausencia y presencia de extracto de levadura, con concentraciones iniciales de 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en cultivo sólido (EPU) después de 7 días de cultivo

<i>Condición de cultivo</i>	<i>BaP biodegradado^a</i> <i>(mg BaP (g soporte seco)⁻¹)</i>	<i>Grado de conversión de BaP^a</i> <i>(mg BaP_{biodeg} mg⁻¹ BaP_{inicial})</i>
<u>Sin extracto de levadura</u>		
0.5 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.222 ± 0.012 A	0.445 ± 0.024 A
5.0 mg (g soporte seco) ⁻¹	2.656 ± 0.573 B	0.531 ± 0.076 A
<u>Con extracto de levadura</u>		
0.5 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.209 ± 0.029 A	0.419 ± 0.059 A
5.0 mg (g soporte seco) ⁻¹	2.570 ± 0.309 B	0.514 ± 0.062 A

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

La concentración inicial de BaP en el cultivo no tuvo efecto significativo en el consumo del compuesto. El grado de conversión de BaP, en el cual el BaP biodegradado está referido a la concentración inicial, resultó estadísticamente igual.

La presencia del extracto de levadura no tuvo efecto significativo sobre la biodegradación del BaP. Esto pudo deberse a que el aporte de carbono del extracto de levadura es cinco veces menor al aportado por el BaP, y aun y cuando se encontraba soluble en el medio, su concentración no fue suficiente para producir algún efecto sobre la biodegradación. Existen reportes sobre el efecto del extracto de levadura sobre la degradación de HAP de 3 y 4 anillos por varios consorcios bacterianos, en donde el carbono proveniente del extracto es mayor al proveniente del BaP. Yuan y col. (2000), encontraron que la biodegradación de fenantreno ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) por bacterias provenientes de efluentes de industrias petroquímicas, se incrementó notablemente obteniéndose tasas de $0.18 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.38 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ d}^{-1}$ en ausencia y presencia del extracto (0.05 mg mL^{-1}), respectivamente. Sin embargo, este mismo grupo de trabajo encontró que la degradación de fenantreno por bacterias presentes en sedimentos no se mejoró por la presencia de extracto de levadura (0.50 mg mL^{-1}) u otras fuentes de carbono, como acetato, lactato y piruvato (Yuan y col., 2001). En estudios sobre la degradación de pireno y creosote (85% HAP) por un cultivo mixto de cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, la presencia de extracto de levadura (1 mg mL^{-1}) incrementó los niveles de desaparición al verse estimulado el crecimiento bacteriano, sin embargo, el aumento en la concentración de dicho extracto produce un efecto contrario perdiéndose la capacidad degradadora del cultivo (Juhasz y col., 2000a).

De la misma forma que en presencia de glucosa la biodegradación de BaP por *A. terreus* en cultivo sólido con EPU, no se modificó por la presencia del extracto de levadura, por esta razón en la Figura 6.4 se presenta la cinética de biodegradación de $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ en medio sólido con EPU como soporte en ausencia de extracto de levadura. En la Figura 6.4 se observa que la concentración del BaP desciende rápidamente durante las primeras 25 horas de cultivo, lo que representa una tasa de consumo de $3.7 \times 10^{-3} \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, posteriormente, no se observó disminución en la concentración, obteniéndose una biodegradación específica de $0.607 \pm 0.018 \text{ mg BaP}_{\text{biodegradado}} \text{ mg}^{-1} \text{ BaP}_{\text{inicial}}$. Este periodo de máximo consumo de BaP corresponde al tiempo de máxima

producción de compuestos hidrosolubles y comienzo de la producción de CO₂. Probablemente, no se obtuvo una biodegradación del 100% de BaP debido a la presencia de algún compuesto hidrosoluble que inhibió la actividad de *A. terreus*, lo cual concuerda con la acumulación de carbono soluble que se reporta en la sección 6.2.1. La recuperación de BaP en los controles estériles fue similar a la obtenida en los controles abióticos, indicando que no ocurrió absorción del BaP en las esporas. Cabe mencionar que los resultados presentados en la Figura 6.4 se encuentran corregidos por la eficiencia de extracción del método.

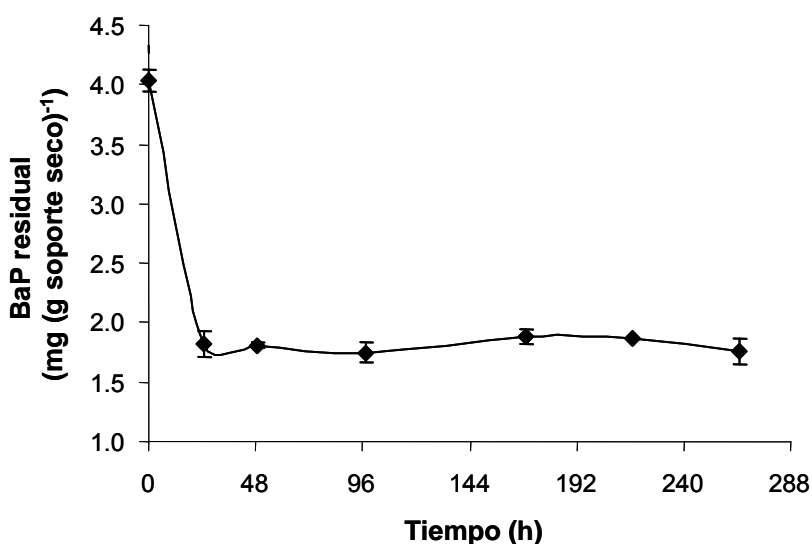


Figura 6.4 Cinética de biodegradación de 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ de por *A. terreus* en cultivo sólido (EPU) en ausencia de extracto de levadura

La mayoría de los estudios cuantitativos de biodegradación de HAP de alto peso molecular por hongos, han sido realizados en presencia de bajas concentraciones de HAP y en presencia de otra fuente de carbono. Por lo tanto, los niveles de remoción de BaP encontrados en el presente trabajo, no pueden ser comparados directamente con la literatura, sin embargo, existen reportes sobre hongos filamentosos capaces de biodegradar BaP en cultivo sólido. Rama-Mercier y col. (1998), reportaron que *A. niger* y *Cunninghamella elegans* biodegradaron el 8 y 47%, respectivamente, de 0.01 mg BaP (g soporte seco)⁻¹, en presencia de 5.7 mg maltosa (g soporte seco)⁻¹

agregados inicialmente a 35 g de arena. *Coniotryrium* sp. y *Fusarium* sp. biodegradaron el 53 y 51%, respectivamente, de $0.134 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$ en suelo enriquecido con glucosa (Potin y col., 2004). En cultivo líquido, Capotorti y col. (2004), reportaron que *A. terreus* fue capaz de biodegradar pireno (0.05 mg mL^{-1}) y BaP (0.025 mg mL^{-1}) en un medio mineral enriquecido con 30 mg mL^{-1} de sacarosa, encontrando remociones del 60 y 27.5%, respectivamente. Por otro lado, al igual que en el presente estudio, este grupo reporta que durante las primeras 48 horas de cultivo obtuvieron la máxima biodegradación de pireno y BaP. En base a lo anterior se puede apreciar, que los niveles de biodegradación de BaP en cultivo sólido reportados en la literatura son similares a los encontrados en este estudio.

Probablemente, la acumulación de compuestos hidrosolubles, así como el hecho de que la biodegradación de BaP no se llevó a cabo completamente, sugiere la presencia de compuestos que inhiben el consumo del BaP.

Después de observar que el BaP es biodegradado y transformado en CO_2 , biomasa y compuestos hidrosolubles, resultó interesante conocer la distribución del carbono en cada uno de los productos del metabolismo de este compuesto.

6.2.4 Balance de carbono

En la Tabla 6.4 se presenta la distribución de carbono del BaP consumido, para cada uno de los cultivos, expresado en rendimientos de producción de biomasa ($Y_{X/S}$), producción de carbono soluble ($Y_{\text{TOC}/S}$) y producción de CO_2 ($Y_{\text{CO}_2/S}$); en el caso de los cultivos adicionados con extracto de levadura, se tomó en cuenta el aporte de carbono correspondiente para la obtención del carbono total consumido.

Tabla 6.4 Balance de carbono expresado en rendimientos de CO₂ ($Y_{CO_2/X}$), biomasa ($Y_{X/S}$) y carbono soluble ($Y_{TOC/S}$) con respecto al carbono de BaP y extracto de levadura. Cultivos sólido (EPU) en ausencia y presencia de extracto de levadura, con 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ de BaP, después de 7 días de cultivo con *A. terreus*

Condición de cultivo	$Y_{X/S}^{a, b}$ (mgC _X mgC _S ⁻¹)	$Y_{TOC/S}^a$ (mgC _{TOC} mgC _S ⁻¹)	$Y_{CO_2/S}^a$ (mgC _{CO2} mgC _S ⁻¹)	Carbono recuperado (%)
<u>Sin extracto de lev</u>				
0.5 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.100 ± 0.01 A	0.128 ± 0.02 A	1.826 ± 0.53 A	205.42
5.0 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.107 ± 0.03 A	0.263 ± 0.02 B	0.265 ± 0.05 B	63.49
<u>Con extracto de lev</u>				
0.5 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.105 ± 0.01 A	0.135 ± 0.04 A	1.982 ± 0.59 A	226.81
5.0 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.111 ± 0.06 A	0.214 ± 0.02 B	0.282 ± 0.06 B	65.98

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

^b El carbono de la biomasa se obtuvo a partir de la siguiente fórmula C₁H_{1.72}O_{0.55}N_{0.17} (Nielsen y col., 2003)

En los cultivos con 0.5 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ se obtienen rendimientos de CO₂ mayores a uno, indicando que el carbono convertido a CO₂ es mayor al carbono proveniente del BaP consumido, lo cual se observa por ende en el porcentaje de carbono recuperado, en donde este es mayor al 100%. Estos resultados confirman lo anteriormente propuesto acerca del consumo de compuestos del EPU. Sin embargo, en los cultivos en ausencia de BaP y en EPU como soporte, se obtuvieron 0.013 ± 0.002 mg biomasa (g soporte seco)⁻¹ y 0.005 ± 0.000 mg carbono soluble (g soporte seco)⁻¹, que al ser comparados con los reportados en la Tabla 6.2 se observa que son significativamente menores, indicando que la mayoría del carbono consumido a partir del EPU es convertido en CO₂ y es poco asimilado para la formación de biomasa.

6.2.5 Conclusiones parciales

A. terreus fue capaz de biodegradar BaP en cultivo sólido con espuma de poliuretano y en ausencia de extracto de levadura con 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ hasta CO₂, biomasa y compuestos hidrosolubles. Debido a la presencia de compuestos carbonados biodegradables contenidos en la EPU utilizada en estos ensayos, esta no fue un buen soporte para estudiar la biodegradación de BaP en cultivo sólido como única fuente de carbono. Por esta razón se realizaron estudios de biodegradación de BaP en cultivo sólido utilizando agrolita como soporte.

6.3 Biodegradación de benzo(a)pireno por *Aspergillus terreus* en agrolita

La agrolita es una mezcla de silicatos resistente al ataque químico. Su estructura interna consiste en numerosos poros llenos de aire, lo que la hace ligera (Rouliá y col., 2003). Su superficie irregular absorbe y retiene líquido, lo que la hace un buen soporte para los cultivos sólidos ya que puede proveer aire, agua y nutrientes a los microorganismos.

Por la naturaleza volcánica de la agrolita, no existen compuestos carbonados que pudieran ser sustratos alternos en la biodegradación de BaP. Se realizó una extracción con DCM de la agrolita contaminada con BaP.

6.3.1 Producción de biomasa y carbono soluble

En la Tabla 6.5 se presenta la producción de biomasa y carbono soluble como consecuencia de la biodegradación en cultivo sólido con agrolita con 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (50.0 mg g⁻¹) por *A. terreus*.

Tabla 6.5 Producción de biomasa y carbono soluble por *A. terreus* en cultivo sólido (agrolita) con 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (50.0 mg g(soporte seco)⁻¹) después 72 horas de cultivo

<i>Fuente de Carbono</i>	Biomasa ^a (mg (g soporte seco) ⁻¹)	Carbono soluble ^a (mg (g soporte seco) ⁻¹)
<i>BaP</i>	0.393 ± 0.078 A	0.958 ± 0.054 A
<i>BaP + Glu</i> ^b	26.545 ± 1.235 B	1.491 ± 0.110 B

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N= 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

^b Datos corregidos con el carbono proveniente de la glucosa residual

En ausencia de glucosa se obtuvieron cerca de 0.4 mg biomasa (g soporte seco)⁻¹, esta concentración de biomasa fue significativamente menor a la obtenida en presencia de glucosa. Este experimento demostró, que en cultivo sólido bajo las condiciones de cultivo estudiadas, *A. terreus* asimiló el carbono del BaP como única fuente de carbono para la formación de biomasa, sin embargo, la producción de biomasa fue baja con respecto a la producida en presencia de glucosa. Debido a que la mayoría de los estudios de biodegradación de BaP en cultivo sólido se realizan en presencia de otra fuente de carbono, no es posible comparar directamente la producción de biomasa con BaP como única fuente de carbono bajo condiciones de cultivo similares. Sin embargo, de manera similar a este trabajo, varios autores reportan bajos niveles de producción de biomasa en cultivo líquido con HAP como BaP y pireno como únicas fuentes de carbono (Verdin y col., 2004; Romero y col., 2002; Launen y col., 1999). Bouchez y col. (1996), propusieron que la baja producción de biomasa a partir de HAP de alto peso molecular, se debe a que en cada reacción de oxigenación en la secuencia de degradación de los HAP hay cuatro electrones que son transferidos, pero que no se encuentran disponibles para la producción de energía, y por lo tanto, de biomasa.

En el cultivo sólido con EPU, a las 72 horas de incubación se obtuvieron 0.782 ± 0.099 mg biomasa (g soporte seco)⁻¹ (Figura 6.2), el cual es significativamente mayor al la obtenida en los cultivos con agrolita. Probablemente la diferencia en la

producción de biomasa entre ambos cultivos se encuentre relacionada con la biodegradación del BaP.

Con el objetivo de asegurar que el metabolismo de BaP, no disminuyera el crecimiento, se realizaron cultivos con glucosa en ausencia de BaP por 72 horas. La biomasa producida en estos cultivos, no fue significativamente distinta a la producida en cultivos con glucosa y BaP, indicando que la concentración de este HAP utilizada no fue inhibitoria para el crecimiento de *A. terreus*.

Por otro lado, en la Tabla 6.5 se presentan los resultados de producción de compuestos hidrosolubles. La producción de carbono soluble fue mayor en los cultivos en presencia de glucosa, cabe mencionar que los valores de carbono soluble obtenidos de los cultivos en presencia de glucosa, están corregidos con el carbono procedente de la glucosa residual. Probablemente, el aumento en la biomasa como resultado del consumo de glucosa, produce mayores niveles de compuestos hidrosolubles. Estos resultados pueden ser comparados con los encontrados por Romero y col. (2002), quienes reportaron que en presencia de 5.0 mg mL^{-1} de glucosa y $0.04 \text{ mg [4,5,9,10] }^{14}\text{C-pireno mL}^{-1}$, la producción de ^{14}C presente en la fase acuosa para los cultivos con *P. variabile*, *Cylindrocarpon didymum* y *Rhodotorula minuta*, aumentó con respecto a los cultivos sin glucosa.

Al comparar, la producción de compuestos hidrosolubles en cultivo sólido con agrolita con los obtenidos en los cultivos con EPU, se observó que a las 72 horas de cultivo existe mayor cantidad de compuestos hidrosolubles en los cultivos con agrolita que en los cultivos con EPU (Figura 6.2), estos resultados indican que la acumulación de compuestos hidrosolubles fue menor en los cultivos con EPU como consecuencia de la mayor producción de biomasa en este soporte, la cual consumió una mayor cantidad de compuestos.

Después de observar que la biodegradación de BaP como única fuente de carbono produjo biomasa y compuestos hidrosolubles, se realizaron ensayos para conocer la mineralización de BaP.

6.3.2 Cinética de producción de CO₂ y mineralización

En la Figura 6.5 se presenta la cinética de producción de CO₂ a partir de la biodegradación de BaP, en ausencia de glucosa por *A. terreus* en cultivo sólido con agrolita con de 5.0 mg BaP g⁻¹. Los resultados graficados son las medias de tres determinaciones.

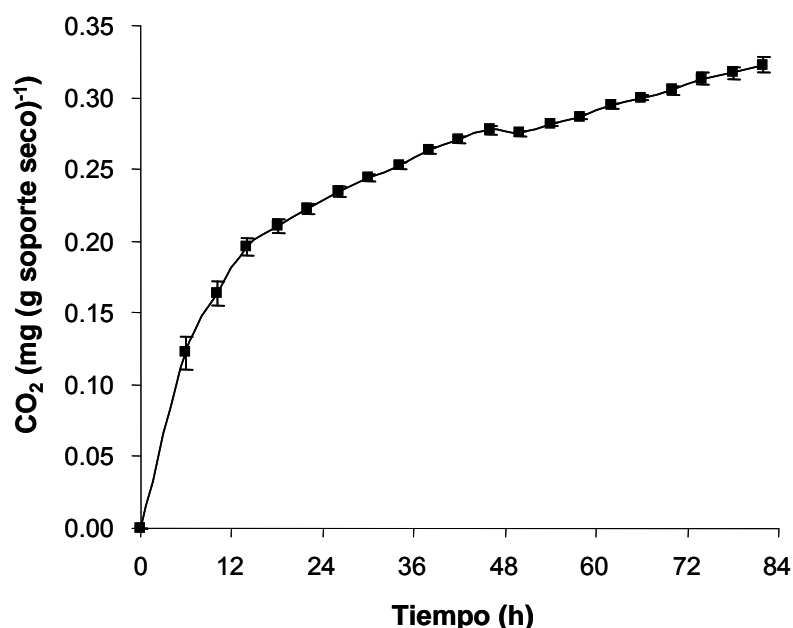


Figura 6.5 Cinética de producción de CO₂ por *A. terreus* en cultivo sólido (agrolita) en ausencia de glucosa

Durante las primeras 18 horas de cultivo se obtuvo la máxima tasa producción de CO₂, con una tasa de producción de 0.014 mg (g soporte seco)⁻¹ h⁻¹. Posteriormente, entre 18 y 84 horas, la tasa disminuyó (1.6×10^{-3} mg (g soporte seco)⁻¹ h⁻¹). Cabe mencionar que los cultivos en ausencia de BaP y glucosa no produjeron CO₂ y que la presencia de compuestos en la espuma de poliuretano que son transformados hasta CO₂, no permitió realizar una comparación precisa entre ambos sistemas, ya que la presencia de estos compuestos incrementó en un orden de magnitud la producción de CO₂ y el tiempo al cual se obtuvo la producción máxima.

Un diverso grupo de hongos ligninolíticos y no ligninolíticos tienen la habilidad de oxidar al BaP, sin embargo, existen pocos reportes sobre hongos en cultivos axénicos que pueden mineralizar BaP. En este trabajo se obtuvo una mineralización de 1.79 ± 0.040 % con $5.0 \text{ mg BaP (g soporte seco)}^{-1}$. Este mismo fenómeno fue observado por Veignie y col. (2002), quienes reportaron que *F. solani* F 33 mineraliza BaP (1.2% de $0.188 \text{ mg BaP mL}^{-1}$) en cultivo líquido durante las primeras 15 horas de cultivo, correspondientes a la etapa de germinación, sugiriendo que las esporas poseen sistemas enzimáticos, constitutivos o inducibles, involucrados en el metabolismo del BaP. Barclay y col. (1995), reportaron que en cultivos con *P. chrysosporium* se mineralizó el 3% del BaP inicial (76 ng mL^{-1}), el cual fue adicionado al medio de cultivo después del consumo total de glucosa. Rama-Mercier y col. (1998), encontraron que en cultivo sólido con 35 g de arena y 10 mL de medio mineral enriquecido con $20 \text{ mg maltosa mL}^{-1}$, *Bjerkandera* BOS 55 y *T. versicolor* ATCC 32745 mineralizaron el 2.1 y 0.5% de los $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ de $[7]^{14}\text{C-BaP}$ iniciales. Como se puede apreciar, el nivel de BaP mineralizado por *A. terreus* en cultivo sólido con agrolita, se encuentra dentro de los niveles reportados en sistemas similares, es importante señalar que la concentración inicial utilizada en este trabajo es muy superior a las reportadas

6.3.3 Biodegradación de benzo(a)pireno

En la Tabla 6.6 se presentan los niveles de biodegradación y tasas de biodegradación de BaP por *A. terreus* en cultivo sólido con agrolita como soporte después de 72 horas de cultivo. No se observaron diferencias significativas en la biodegradación ni en las tasas de biodegradación de BaP en ausencia y presencia de glucosa. El grado de conversión de BaP expresado en $\text{mg BaP}_{\text{biodegradado}} \text{ mg}^{-1} \text{ BaP}_{\text{inicial}}$ fue de 0.275 ± 0.036 y 0.314 ± 0.024 para los cultivos en ausencia y presencia de glucosa, respectivamente.

Tabla 6.6 Biodegradación de BaP y tasas de biodegradación por *A. terreus* en cultivo sólido (agrolita) con 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (50.0 mg (g soporte seco)⁻¹) después de 72 horas de cultivo

<i>Fuente de Carbono</i>	Biodegradación ^a (mg (g soporte seco) ⁻¹)	Tasa de biodegradación ^a (mg (g soporte seco) ⁻¹ d ⁻¹)
<i>BaP</i>	1.375 ± 0.180 A	0.458 ± 0.060 A
<i>BaP + Glu</i>	1.568 ± 0.120 A	0.522 ± 0.040 A

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N= 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

De manera similar, Romero y col. (2002), encontraron que la presencia de 5.0 mg glucosa mL⁻¹ en el medio de cultivo no tuvo efecto en la biodegradación de pireno (0.04 mg mL⁻¹) por *Rhodotorula glutinis* después de 14 días de cultivo, encontrando una biodegradación específica de 0.370 ± 0.043 mg BaP biodegradado mg⁻¹ BaP inicial.

La razón por la que la glucosa no influye en la biodegradación de BaP por *A. terreus* bajo estas condiciones de cultivo, puede ser explicado con las observaciones de Veignie y col. (2002), quienes encontraron que en un cultivo líquido en presencia de glucosa, *F. solani* F33 metaboliza el BaP durante la germinación (primeras 15 horas de incubación), tiempo durante el cual no hubo consumo de glucosa. Posterior a las 15 horas de cultivo se detuvo el consumo de BaP y comenzó en consumo de glucosa. Posteriormente, encuentran un segundo periodo de mineralización de BaP ocurrido entre las 150 y 218 horas de cultivo, correspondientes al agotamiento de la glucosa y a la fase de muerte del hongo. Estas dos fases fisiológicas (germinación y muerte) están caracterizadas por un importante consumo de lípidos, tanto en esporas (almacenamiento energético) como en micelio (Morozova y col., 2002), lo que sugiere que las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, pueden estar implicadas en el metabolismo del BaP. Esta hipótesis está reforzada por el hecho de que durante el consumo de glucosa existe represión del catabolismo de lípidos induciendo así la represión del metabolismo del BaP.

Por otro lado, se ha reportado que la presencia de glucosa en el medio de cultivo aumenta la actividad del citocromo P450 en *A. fumigatus*, sin embargo, la inducción de ésta actividad no altera la actividad específica del metabolismo de BaP (Venkateswarlu y col., 1996), por lo que la presencia de glucosa no produce un aumento en el consumo de BaP.

Al comparar la biodegradación de BaP obtenida en los cultivos con EPU y los obtenidos en agrolita, se encuentra que en esta última fue menor (53 y 27% respectivamente). Esto sugiere al menos dos hipótesis: 1) la biodegradación de los compuestos del EPU, a diferencia de la glucosa, inducen la biodegradación de BaP y 2) debido a las diferencias físicas entre ambos soportes, el BaP se encontraba más biodisponible en el EPU que en la agrolita. Estos resultados confirman la propuesta realizada en la sección 6.3.1, en donde se sugiere que la diferencia en la cantidad de biomasa entre los cultivos con EPU y con agrolita se debió a un mayor consumo de BaP en los cultivos con EPU.

Estos ensayos demostraron que *A. terreus* biodegrada BaP en presencia y ausencia de glucosa y como resultado el BaP es transformado en CO₂, biomasa y compuestos hidrosolubles. Para conocer la distribución del carbono a partir del BaP biodegradado, así como discutir de manera más precisa sobre las diferencias del metabolismo de BaP por *A. terreus* en cultivo sólido con EPU y agrolita, se realizaron balances de carbono.

6.3.4 Balance de carbono y actividad respiratoria

En la Tabla 6.7 se presenta la distribución del carbono del BaP consumido y de la mezcla de BaP y glucosa consumidos, por *A. terreus* en cultivo sólido con agrolita después de 72 horas de incubación. Los resultados se expresan en rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$), rendimiento de carbono soluble ($Y_{TOC/S}$) y en rendimiento de CO₂ ($Y_{CO_2/S}$), con respecto al carbono del sustrato.

Tabla 6.7 Balance de carbono en rendimientos de CO₂ (Y_{CO₂/S}), biomasa (Y_{X/S}) y carbono soluble (Y_{TOC/S}) de la biodegradación de BaP por *A. terreus* es cultivo sólido (agrolita) con 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (50.0 mg (g soporte seco)⁻¹ a 72 horas de cultivo

	Y _{X/S} ^{a, b} (mgC _X mgC _S ⁻¹)	Y _{TOC/S} ^a (mgC _{TOC} mgC _S ⁻¹)	Y _{CO₂/S} ^a (mgC _{CO₂} mgC _S ⁻¹)	Carbono recuperado (%)
BaP	0.145 ± 0.044 A	0.733 ± 0.303 A	0.065 ± 0.007 A	94.33
BaP+Glu	0.617 ± 0.117 B	0.108 ± 0.025 B	0.248 ± 0.084 B	97.32

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N= 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

^b El carbono de la biomasa se obtuvo a partir de la siguiente fórmula C H_{1.72} O_{0.55} N_{0.17} (Nielsen y col., 2003)

En los cultivos en ausencia de glucosa, el carbono del BaP consumido se encontró principalmente en compuestos hidrosolubles (73%), cerca del 15% del carbono consumido fue asimilado para la formación de biomasa, y menos del 10% fue transformado en CO₂. Estos resultados indican que el BaP es oxidado preferentemente hasta compuestos hidrosolubles.

Este comportamiento ha sido reportado para la biodegradación de HAP por varios hongos. Steffen y col. (2002), estudiaron la biodegradación de 0.05 mg [7,10] ¹⁴C-BaP (g soporte seco)⁻¹ en cultivo sólido en 2.5 g de bagazo de trigo, por *Agrocide praecox* TM 70.84, *Stropharia coronilla* TM 47-1 y *Stropharia rugosoannulata* DSM 11372, encontrando que entre el 64 y 80% del ¹⁴C consumido fue acumulado en la fase acuosa, mientras que el 11 y 18% fue convertido en ¹⁴CO₂. En estudios de biodegradación con 0.1 μg g⁻¹ de [7]¹⁴C-BaP cultivo sólido, con 35 g de arena y 10 mL de medio mineral con maltosa (20 mg mL⁻¹), se encontró el 61 y 35% del ¹⁴C consumido en la fase acuosa a partir de los cultivos con *C. elegans* ATCC 26269 y *A. niger* 28816 MUCL, respectivamente, encontrándose también que estos dos hongos no produjeron ¹⁴CO₂ (Rama-Mercier y col., 1998)

Comparando el balance de carbono obtenido de los cultivos con EPU y los cultivos con agrolita para la biodegradación de BaP en ausencia de glucosa, se encontraron dos diferencias principales. El rendimiento de carbono soluble de los cultivos con

agrolita fue dos veces mayor con respecto al obtenido en cultivos con EPU, esto sugiere que en los cultivos con agrolita hubo una mayor acumulación de compuestos hidrosolubles. El carbono convertido en CO₂ de los cultivos con EPU, fue mayor al encontrado para los cultivos con agrolita, esto es debido al aporte de los compuestos del EPU. Con respecto al rendimiento de la producción de biomasa no se encontraron diferencias significativas entre ambos cultivos, indicando que los compuestos procedentes del EPU no son incorporados a biomasa, esto confirma lo propuesto en la sección 6.2.4.

Los resultados de la Tabla 6.7 concordaron con los encontrados en el análisis de actividad respiratoria, calculado a las 72 horas de cultivo. El valor calculado para el rendimiento de biomasa en O₂ (Y_{X/O_2} , mg biomasa mg⁻¹ O₂) fue de 0.795 ± 0.181 indicando que el oxígeno consumido fue mayor al oxígeno utilizado para la formación de biomasa y CO₂. Esto indica que el oxígeno consumido es incorporado al BaP lo cual es consistente a lo encontrado en el balance de carbono, en donde se observa un alto rendimiento en la producción de compuestos hidrosolubles ($Y_{TOC/S}$). El valor del coeficiente respiratorio (CR, mmol CO₂ mmol⁻¹ O₂) encontrado fue de 0.727, el cual corresponde con lo reportado para la biodegradación de hidrocarburos. Dilly (2003), reportó que debido a la baja oxidación de los hidrocarburos el CR tiene un valor de 0.7, esto indicó que en este estudio existe un equilibrio entre el catabolismo y el anabolismo de *A. terreus* durante la biodegradación de BaP en cultivo sólido con agrolita. Por otro lado, el rendimiento de CO₂ en biomasa ($Y_{CO_2/X}$, mg CO₂ mg⁻¹ biomasa) encontrado (0.683 ± 0.066) muestra que la producción de biomasa a partir del BaP es mayor con respecto al CO₂, indicando que bajo estas condiciones de cultivo, el carbono disponible del BaP oxidado es mayormente utilizado para la formación de biomasa y no es mineralizado.

6.3.5 Conclusiones parciales

A. terreus biodegradó altas concentraciones de BaP en ausencia y presencia de glucosa en cultivo sólido con agrolita como soporte, la presencia de la glucosa en el

medio no tuvo efecto sobre la biodegradación. Como resultado de la biodegradación de BaP se obtuvieron biomasa, CO₂ y compuestos hidrosolubles, siendo estos últimos los más abundantes. La agrolita, a diferencia del EPU, permitió el análisis de la biodegradación de BaP como única fuente de carbono en cultivo sólido.

Con el objetivo de conocer la capacidad *A. terreus* para biodegradar altas concentraciones de BaP en cultivo líquido y analizar los cambios en el metabolismo del BaP como resultado de la modificación de las condiciones de cultivo, se realizaron ensayos en cultivo líquido.

6.4 Biodegradación de benzo(a)pireno por *Aspergillus terreus* en cultivo líquido

Este experimento se realizó en cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ en ausencia y presencia de 5.0 mg glucosa mL⁻¹, la biodegradación de BaP fue evaluada con la producción de biomasa, carbono soluble y CO₂, así por la remoción de BaP del cultivo después de 72 horas.

6.4.1 Producción de biomasa y carbono soluble

En la Tabla 6.8 se presenta la producción de biomasa y carbono soluble a partir de la oxidación de BaP en presencia y ausencia de glucosa por *A. terreus* en cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹, a las 72 horas de cultivo. La presencia de la glucosa en el medio de cultivo generó una mayor producción de biomasa con respecto a la producida en los cultivos con solo BaP como fuente de carbono.

Después de 72 horas de cultivo en presencia de BaP como única fuente de carbono se encontró cerca de 1 µg biomasa mL⁻¹, este valor se encuentra por debajo de lo reportado para la biodegradación de HAP de alto peso molecular como única fuente de carbono. Romero y col. (2002), reportaron 0.055 mg biomasa mL⁻¹ de *F. solani*, después de 17 días de cultivo líquido con 0.04 mg mL⁻¹ de [4,5,9,10] ¹⁴C-pireno como

única fuente de carbono y energía. Por otro lado, a diferencia de este estudio, Capotorti y col. (2004), reportaron que el pireno y el BaP como única fuente de carbono en cultivo líquido y por separado, no pueden soportar el crecimiento de *A. terreus*.

Tabla 6.8 Producción de biomasa y carbono soluble por *A. terreus* en cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (5.0 mg ml⁻¹) a 72 horas de cultivo

Fuente de carbono	Biomasa (mg mL ⁻¹) ^a	Carbono soluble (mg mL ⁻¹) ^a
BaP	0.009 ± 0.001 A	0.038 ± 0.006 A
BaP+Glu	2.199 ± 0.280 B	0.184 ± 0.110 ^b B

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N= 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, mayúsculas para columnas

^b Dato corregido con el carbono proveniente de la glucosa residual

La presencia de glucosa en el cultivo líquido generó una mayor producción de carbono soluble. De forma similar, Launen y col. (1999), reportaron que la presencia de glucosa en el medio de cultivo incrementó la producción de 1-pirenol y pirequinonas, productos de oxidación del pireno por *P. janthinellum*. Estos resultados sugieren que en cultivo líquido la glucosa induce la formación de estos compuestos; de manera similar a lo ocurrido en cultivo sólido con agrolita, el aumento en la biomasa es resultado del consumo de la glucosa lo que produce un incremento en la formación de compuestos hidrosolubles, o bien, posiblemente en cultivo líquido en presencia de glucosa se incrementa la biodegradación de BaP, aumentándose así la producción de compuestos hidrosolubles.

En comparación con lo encontrado en cultivo sólido con agrolita, la producción de biomasa y carbono soluble en cultivo líquido fue significativamente menor, sugiriendo que en este sistema la biodegradación de BaP fue menor, probablemente debido a la presencia de compuestos hidrosolubles inhibitorios de la actividad de *A. terreus*. Con el objetivo de estudiar esto se analizó la producción de CO₂ durante las 72 horas de cultivo.

6.4.2 Cinética de producción de CO₂ y mineralización

En la Figura 6.6 se presenta la cinética de producción de CO₂ durante la biodegradación de BaP en cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ en ausencia de glucosa. Durante las primeras 18 horas se observó una fase de adaptación del cultivo, después de la cual la producción de CO₂ aumentó hasta 0.034 mg mL⁻¹ a las 72 horas de cultivo. Entre las 18 horas y el final del cultivo se presentó un incremento en la producción de CO₂ con una tasa de 0.015 mg CO₂ mL⁻¹ d⁻¹.

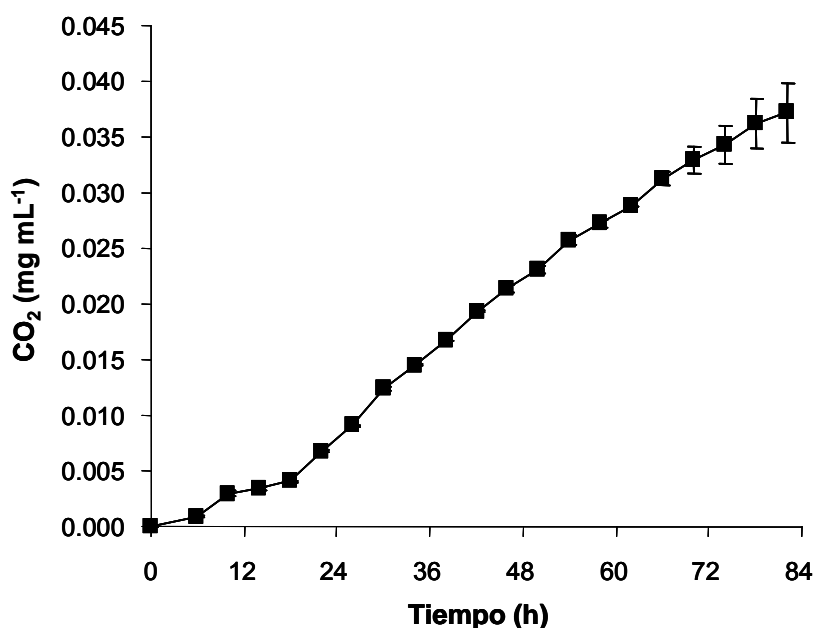


Figura 6.6 Cinética de producción de CO₂ por *A. terreus* en cultivo líquido en ausencia de glucosa

La presencia de una fase de adaptación en las cinéticas de producción de CO₂ a partir de la biodegradación de varios HAP en cultivo líquido ha sido reportada en la literatura para hongos como *Agrocibe praecox*, *Stropharia coronilla*, *Nematoloma frowardii*, *Penicillium janthinellum*, *T. versicolor*, entre otros (Steffen y col., 2002; Boonchan y col., 2000; Sack y col., 1997). En el presente trabajo, la cinética de producción de CO₂ en cultivo sólido con agrolita (Figura 6.5) no presentó un periodo de adaptación y tiene forma sigmoideal, en contraste, en el cultivo líquido se presenta

una fase de adaptación seguida de una fase de crecimiento exponencial. Este fenómeno ha sido reportado por Sack y col. (1997), quienes observaron este mismo comportamiento de producción de CO₂, al comparar la mineralización de 0.05 mg pireno mL⁻¹ en cultivo líquido y 1 mg pireno (g soporte seco)⁻¹ en cultivo sólido con bagazo de trigo, por *T. versicolor* PKS T08-1 y *Kuehneromyces mutabilis* DSM 11212. Estos resultados sugieren que en cultivo sólido la oxidación del BaP por *A. terreus*, se lleva a cabo durante las primeras horas, mientras que en cultivo líquido ésta oxidación se lleva a cabo después de un periodo de adaptación de aproximadamente 18 horas. Probablemente, esto es debido a la presencia de mayor cantidad de BaP disuelto en el medio en el cultivo líquido con respecto al sólido.

La mineralización obtenida de la biodegradación de BaP en cultivo líquido por *A. terreus* fue de 1.964 ± 0.099 %. Comparando la mineralización obtenida en cultivo líquido con la obtenida en cultivo sólido con agrolita (sección 6.3.2), se observa que no hay diferencias significativas, lo cual probablemente se deba a que la biodegradación de BaP en ambos casos fue similar.

Sin embargo, esto último contradice lo propuesto en la sección 6.4.1, en donde se propone que la producción de biomasa en cultivo líquido en ausencia de glucosa es menor, debido a que la biodegradación fue menor bajo estas condiciones. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis se realizó el análisis del consumo de BaP por *A. terreus* en cultivo líquido después de 72 horas de cultivo.

6.4.3 Biodegradación de benzo(a)pireno

En la Tabla 6.9 se presenta la biodegradación de BaP y tasas de biodegradación por *A. terreus* en medio líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ en presencia y ausencia de glucosa (5.0 mg mL⁻¹) después de 72 horas de cultivo.

Tabla 6.9 Biodegradación y tasas de biodegradación de 0.5 mg BaP mL⁻¹ por *A. terreus* en cultivo líquido en ausencia y presencia de glucosa (5.0 mg mL⁻¹) después de 72 horas de cultivo

<i>Fuente de carbono</i>	<i>Biodegradación</i> ^a (mg mL ⁻¹)	<i>Tasa de biodegradación</i> ^a (mg mL ⁻¹ d ⁻¹)
BaP	0.060 ± 0.001 A	0.020 ± 0.004 A
BaP+Glu	0.131 ± 0.056 B	0.044 ± 0.018 B

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N = 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

Se obtuvo una biodegradación, en ausencia de glucosa, de 0.120 ± 0.002 mg BaP_{biodegradado} mg⁻¹ BaP_{inicial}, este valor se encuentra dentro de los niveles de biodegradación reportados en la literatura, para ensayos en cultivo líquido en ausencia de glucosa. Wunch y col. (1997), reportaron que *A. ochraceus*, *A. parasiticus* y *A. niger* biodegradan respectivamente el 50, 8 y 3% de los 0.025 mg BaP mL⁻¹ iniciales en un cultivo líquido en ausencia de otra fuente de carbono, en 17 días.

La biodegradación encontrada en medio líquido en ausencia de glucosa fue 2.2 veces menor a la obtenida en cultivo sólido con agrolita. Esto pudo deberse a que probablemente el BaP fue biodegradado en el interior de la célula (Vo-Dinh y col., 2000) y posiblemente el BaP que es transportado al interior de la célula, sea aquel que se encuentra disuelto en el medio. Debido a la baja solubilidad del BaP en agua, una alta concentración de cristales de BaP se suspendieron en el medio de cultivo, sobre la superficie de estos cristales se observó crecimiento de micelio de *A. terreus*, el cual formó una película alrededor de los cristales disminuyendo el transporte de masa al medio y por lo tanto la biodegradación. A diferencia de esto, en los cultivos sólidos el BaP dispersó mas en los soportes, lo que impidió la colonización de todos los cristales, permitiendo que algunos de estos estuvieran en contacto con el medio de cultivo por lo tanto se encontrara BaP soluble en el medio acuoso.

En cultivo líquido, a diferencia del cultivo sólido, la biodegradación y la tasa de biodegradación de BaP aumentó por la presencia de glucosa en el medio,

obteniéndose valores de grado de conversión de $0.262 \pm 0.112 \text{ mg BaP}_{\text{biodegradado}} \text{ mg}^{-1} \text{ BaP}_{\text{inicial}}$. Esta diferencia en el metabolismo de *A. terreus* podría atribuirse a la concentración de glucosa utilizada para cada cultivo, $22.6 \text{ mg (g soporte seco)}^{-1}$ y 5 mg mL^{-1} para el cultivo sólido y líquido, respectivamente, en donde la concentración baja en cultivo líquido favorece la biodegradación de BaP. Lo anterior pudo deberse a que altas concentraciones de glucosa reprimen la hidroxilación del BaP, igual que lo reportado por Launen y col. (1999), quienes observaron que la presencia de concentraciones mayores a 5% de glucosa en medio líquido, inhibieron la oxidación de pireno (0.04 mg mL^{-1}) por *P. janthinellum*, mientras que por debajo de esta concentración de glucosa el metabolismo de pireno se favoreció.

Con estos resultados se concluyó que la disminución en la producción de biomasa en cultivo líquido, se debió a la disminución en la biodegradación de BaP, sin embargo esto no explica por que la mineralización en el cultivo líquido y cultivo sólido con agrolita son iguales, lo que sugiere que en cultivo líquido se presenta una mayor mineralización de los compuestos hidrosolubles. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis se realizó el análisis de la distribución del carbono en cada uno de los productos del metabolismo de este compuesto en cultivo líquido.

6.4.4 Balance de carbono y actividad respiratoria

La distribución del carbono proveniente de la biodegradación de BaP en ausencia y presencia de glucosa por *A. terreus*, después de 72 horas de cultivo se muestran en la Tabla 6.10. Los resultados están expresados como rendimientos de la producción de biomasa ($Y_{X/S}$), carbono soluble ($Y_{\text{TOC}/S}$) y CO_2 ($Y_{\text{CO}_2/S}$) con respecto al carbono del sustrato consumido.

Tabla 6.10 Balance de carbono en rendimiento de CO₂ (Y_{CO₂/S}), biomasa (Y_{X/S}) y carbono soluble (Y_{TOC/S}) de la biodegradación de BaP por *A. terreus* es cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ en ausencia y presencia de glucosa (5.0 mg mL⁻¹) a 72 horas de cultivo

Fuente de carbono	Y _{X/S} ^{a, b} (mgC _X mgC _S ⁻¹)	Y _{TOC/S} ^a (mgC _{TOC} mgC _S ⁻¹)	Y _{CO₂/S} ^a (mgC _{CO₂} mgC _S ⁻¹)	Carbono recuperado (%)
BaP	0.078 ± 0.003 A	0.689 ± 0.245 A	0.168 ± 0.047 A	93.42
BaP+Glu	0.581 ± 0.139 B	0.265 ± 0.148 B	0.252 ± 0.053 A	109.74

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N= 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas

^b El carbono de la biomasa se obtuvo a partir de la siguiente fórmula C H_{1.72} O_{0.55} N_{0.17} (Nielsen y col., 2003)

De forma similar a lo ocurrido en cultivo sólido con agrolita, cerca del 70% del carbono se encontró en forma de carbono soluble, indicando que en este sistema también existe una acumulación en la fase acuosa de compuestos provenientes de la oxidación del BaP. El 17% del carbono fue utilizado para la producción de CO₂ y el 8% asimilado para la producción de biomasa, este comportamiento es contrario a lo ocurrido en cultivo sólido con agrolita (Tabla 6.7), sugiriendo que bajo condiciones de cultivo líquido, existe una mayor mineralización del BaP, y a su vez, menor asimilación del carbono para la formación de biomasa, confirmando lo propuesto al final de la sección 6.4.3.

La actividad respiratoria de *A. terreus* en cultivo líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ en ausencia de glucosa, confirma lo encontrado en el balance de carbono, en donde el valor de Y_{X/O₂} es 0.469 ± 0.101 mg biomasa mg⁻¹ O₂ y el CR 0.686 mmol CO₂ mmol⁻¹ O₂ indicando que el oxígeno consumido es incorporado al BaP durante su biodegradación. El valor de CR cercano a 0.7 sugiere que bajo las condiciones de cultivo líquido, hay un equilibrio entre el catabolismo y el anabolismo, análogo a lo encontrado para la biodegradación de BaP en cultivo sólido con agrolita. El valor obtenido del rendimiento de producción de CO₂ con respecto a la producción de biomasa (Y_{CO₂/X}) fue de 3.81 ± 0.39 mg CO₂ mg⁻¹ biomasa, indicando que en cultivo líquido el carbono proveniente de la biodegradación de BaP, es preferentemente convertido en CO₂, ya que los altos valores de éste rendimiento indican que una

mayor proporción del carbono del sustrato en mineralizado a CO₂ (Holubar y col., 1999).

6.4.5 Conclusiones parciales

En cultivo líquido, *A. terreus* biodegradó BaP en ausencia y presencia de glucosa, la presencia de este azúcar en el medio de cultivo, favoreció la biodegradación. Como resultado de la biodegradación de BaP se produjeron compuestos hidrosolubles, biomasa y CO₂. La modificación de las condiciones de cultivo (líquido y sólido) tuvo como consecuencia cambios en el metabolismo del BaP por *A. terreus*, como por ejemplo el efecto de la glucosa en la biodegradación de BaP, las diferencias presentadas en el comportamiento de la cinética de producción de CO₂ y la producción de biomasa. Sin embargo, en ambos cultivos se presentó acumulación de compuestos hidrosolubles y no se biodegradó completamente el BaP.

6.5 Biodegradación de compuestos hidrosolubles por *Aspergillus terreus*

Debido a que la biodegradación de BaP en cultivo sólido y cultivo líquido por *A. terreus* no fue completa y a la acumulación de compuestos hidrosolubles, se propuso la hipótesis de la presencia de un compuesto, producto de la oxidación del BaP y presente en la fase acuosa, que inhibió la biodegradación del BaP y otros compuestos intermediarios de oxidación del BaP. Para comprobar la hipótesis se diseñó un experimento en donde se inocularon esporas frescas de *A. terreus* en los extractos acuosos y después de 72 horas de incubación se evaluó el contenido de carbono soluble y la producción de biomasa. En un experimento previo se observó que la adición de minerales (C/N 15) a los mismos extractos acuosos no propició el consumo del carbono soluble, descartando el posible agotamiento de minerales como causa de la suspensión de la biodegradación.

Debido a lo anterior, se realizaron cultivos con los extractos acuosos procedentes de los ensayos de biodegradación con 0.5 y 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ en cultivo sólido con EPU en ausencia y presencia de extracto de levadura y de los obtenidos a partir de los ensayos en cultivo sólido (agrolita) y cultivo líquido en ausencia de glucosa.

En la Tabla 6.11 se presentan las concentraciones iniciales y finales de carbono soluble, así como el consumo del carbono presente en los extractos.

Tabla 6.11 Consumo del carbono soluble de los extractos acuosos por esporas frescas de *A. terreus*

Condición de cultivo	<i>C inicial</i> ^a (mg (g soporte seco) ⁻¹ o mL ⁻¹)	<i>C final</i> ^a (mg (g soporte seco) ⁻¹ o mL ⁻¹)	<i>C consumido</i> ^a (mg (g soporte seco) ⁻¹ o mL ⁻¹) ^a
<i>EPU</i>			
<i>Sin extracto de levadura</i>			
0.5 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.027 ± 0.004 Aa	0.025 ± 0.001 Aa	0.002 ± 0.000 A
5.0 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.662 ± 0.057 Ba	0.285 ± 0.060 Bb	0.377 ± 0.060 B
<i>Con extracto de levadura</i>			
0.5 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.039 ± 0.009 Aa	0.027 ± 0.002 Aa	0.012 ± 0.004 A
5.0 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.728 ± 0.069 Ba	0.262 ± 0.053 Bb	0.466 ± 0.053 B
<i>Agrolita</i>^b			
5.0 mg (g soporte seco) ⁻¹	0.958 ± 0.054 Ca	0.303 ± 0.031 Bb	0.656 ± 0.071 C
<i>Líquido</i>^b			
0.5 mg mL ⁻¹	0.038 ± 0.006 Aa	0.026 ± 0.003 Ab	0.012 ± 0.005 A

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N= 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas y minúsculas para renglones

^b A partir de cultivos en ausencia de glucosa

En esta sección se denominarán cultivos sólidos, a aquellos cultivos realizados a partir de los extractos acuosos procedentes de los ensayos de biodegradación de

BaP en EPU o agrolita, según sea el caso, y cultivos líquidos a los cultivos con los extractos acuosos provenientes de los ensayos de biodegradación de BaP en cultivo líquido.

El mayor consumo de carbono soluble se presentó en los cultivos sólidos con agrolita, seguido por el consumo de los extractos de los cultivos sólidos con EPU, tanto en ausencia como en presencia de extracto de levadura con 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹. En contraste, el consumo en los extractos de los cultivos sólidos con EPU (0.5 mg BaP (g soporte seco)⁻¹) y el de los cultivos líquidos, no fue diferente significativamente.

Al analizar el carbono residual después de 72 horas de cultivo, con respecto al carbono total presente en el BaP_{inicial} (mg C_{acumulado} mg⁻¹ C-BaP_{inicial}), se encontró que para todos los casos el carbono final acumulado corresponde aproximadamente al 6% del carbono total. Sugiriendo que independientemente de las condiciones de cultivo previas, en la biodegradación de BaP por *A. terreus*, el 6% del C-BaP no es metabolizable y permanecerá en la fase acuosa como compuestos hidrosolubles derivados de la oxidación parcial del BaP. Sin embargo, al ser evaluados con respecto al carbono del BaP biodegradado (mg C_{acumulado} mg⁻¹ BaP-C_{biodegradado}), se observó que el tipo de cultivo si influye en la acumulación, los resultados se presentan en la Tabla 6.12.

El carbono soluble acumulado en los cultivos sólidos con EPU no presentaron diferencias significativas entre sí, encontrándose que aproximadamente el 11% del carbono consumido total se acumuló en la fase acuosa, en el caso de los cultivos sólidos con agrolita alrededor del 23% del carbono consumido es acumulado, mientras que para el cultivo líquido cerca del 45% del carbono se acumula. Estos resultados sugieren que las condiciones de cultivo en las que se llevó a cabo la biodegradación de BaP, son un factor importante para su metabolismo, ya que probablemente los compuestos producidos por la oxidación de BaP sean distintos para cada uno de los cultivos, siendo más metabolizables los producidos en cultivo sólido con respecto a los producidos en cultivo líquido.

Tabla 6.12 Rendimiento de la producción de biomasa por el consumo del carbono soluble ($Y_{X/S}$) la proporción de carbono total residual con respecto al carbono proveniente del BaP biodegradado

Condición de cultivo	$Y_{X/S}^a$ ($\text{mgC}_X \text{ mgC}_S^{-1}$)	C residual ^a ($\text{mg C mg}^{-1} \text{BaP-C biodegradado}$)
<i>EPU</i>		
<i>Sin extracto de levadura</i>		
0.5 mg g^{-1}	0.127 ± 0.044 A	0.118 ± 0.004 A
5.0 mg g^{-1}	0.734 ± 0.297 B	0.113 ± 0.023 A
<i>Con extracto de levadura</i>		
0.5 mg g^{-1}	0.196 ± 0.041 A	0.136 ± 0.010 A
5.0 mg g^{-1}	0.679 ± 0.198 B	0.107 ± 0.021 A
<i>Agrolita^b</i>		
5.0 mg g^{-1}	0.605 ± 0.061 B	0.231 ± 0.024 B
<i>Líquido^b</i>		
0.5 mg g^{-1}	0.136 ± 0.084 A	0.456 ± 0.053 C

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N= 3

^a Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, letras mayúsculas para columnas y minúsculas para renglones

^b A partir de cultivos en ausencia de glucosa

En la Tabla 6.12 también se presentan los rendimientos de la producción de biomasa a partir del consumo de compuestos hidrosolubles. La producción de biomasa fue dependiente de la concentración de carbono inicial y de la concentración de carbono consumido. En los extractos provenientes de los cultivos sólidos con 5.0 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ se encontró que entre el 60 y 73% del carbono consumido fue utilizado para la formación de biomasa, en los cultivos sólidos con 0.5 mg BaP (g soporte seco)⁻¹ y líquido con 0.5 mg BaP mL⁻¹ solamente entre el 12 y 20%, respectivamente, del carbono consumido se incorporó a biomasa. Estos resultados confirman que ciertos compuestos producidos por la biodegradación del BaP son

incorporados a biomasa. Capotorti y col. (2004), observaron que *A. terreus* produce 1-hidroxipireno a partir de la biodegradación del pireno, a su vez, este metabolito es biodegradado produciendo un aumento en la biomasa. Por otro lado, Meulenbergh y col. (1997), reportaron que para ciertos HAP la oxidación parcial de la molécula incrementa su biodegradación, como en el caso del antraceno y de la 9,10-antraquinona en donde este último fue mayormente biodegradado y mineralizado que el antraceno, produciendo como resultado un aumento en la concentración de biomasa.

6.5.1 Conclusiones parciales

La biodegradación de BaP por *A. terreus* produjo compuestos solubles en agua, los cuales fueron parcialmente biodegradados por *A. terreus*. La permanencia del carbono en el medio se debió a la presencia de compuestos no metabolizables. El tipo de cultivo utilizado en la biodegradación de BaP fue un factor importante en la producción y consumo de compuestos hidrosolubles, sugiriendo que el metabolismo de BaP depende de las condiciones de cultivo y por lo tanto, hay diferencias en los compuestos hidrosolubles.

A partir de la biodegradación de BaP en cultivo líquido y cultivo sólido con agrolita se obtuvieron los mayores niveles de carbono soluble residual con respecto al carbono del BaP consumido, lo que indicó la presencia de compuestos inhibitorios para *A. terreus*.

Debido a esto, se diseñó un experimento en donde se analizó la actividad deshidrogenasa producida a partir del consumo del carbono soluble, como medida de la actividad metabólica de *A. terreus* en presencia de estos sustratos parcialmente oxidados.

6.6 Actividad deshidrogenasa

Las rutas metabólicas reportadas de biodegradación de HAP por hongos, indican que no existe una sola ruta de biodegradación, generalmente, los HAP son oxidados en carbonos diferentes, generando diversos metabolitos dentro de los que se encuentran óxidos de areno, *trans*-dihidrodiol, fenoles, quinonas, dihidrodiol-epóxidos y compuestos conjugados con sulfato, ácido glucurónico o glucosa (Wunder y col., 1997; Sutherland y col., 1993; Datta y Samanta, 1988; Cerniglia y Gibson, 1979). El carácter químico de dichos compuestos puede conferirle propiedades inhibitorias o de menor recalcitrancia por lo que algunos productos son acumulados y otros oxidados hasta CO₂. La acumulación de metabolitos del pireno en la biomasa de *P. janthinellum* sugirió que las pirequinonas son metabolizadas a productos capaces de unirse a la célula (Launen y col., 1999). Las quinonas son electrófilos suaves y se pueden unir directamente a los nucleófilos (glutathion y proteínas) dentro de la célula. Alternativamente, en la presencia de agentes reductores las quinonas pueden ser reducidas a radicales semiquinonas, los cuales pueden reaccionar con las macromoléculas celulares o con el oxígeno en el ciclo redox, generando especies oxigenadas reactivas, Flowers y col. (1997), demostraron que la naftoquinona y el 7,8-benzo(a)pirenodiona pueden ser reducidos a sus correspondientes radicales semiquinonas por NADPH y estos radicales se unen al ADN y al oxígeno en el ciclo redox, produciendo efectos dañinos en las células. La dihidrodiol deshidrogenasa (DD) está implicada en la detoxificación de metabolitos carcinógenos de los HAP, como los *trans*-dihidrodiol y dihidrodiol-epoxidos, los productos de reacción de la DD son catecoles transitorios los cuales se auto oxidan a *o*-quinonas (Penning, 1993).

Debido a lo anterior se propuso que durante la biodegradación de BaP y de los compuestos hidrosolubles por *A. terreus*, los compuestos que inhiben su biodegradación podrían ser *o*-quinonas y por lo tanto se encontraría actividad deshidrogenasa. A partir de esto, se realizó un experimento en donde se observó la actividad deshidrogenasa producida a partir del consumo del BaP y compuestos

hidrosolubles de los cultivos con extractos acuosos provenientes de los cultivos sólido con agrolita y líquido.

La actividad deshidrogenasa fue evaluada mediante una reacción de oxígeno-reducción colorimétrica, basada en la reducción de la sal de tetrazolio WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-bencen disulfonato) a formazán por células activas (Figura 6.10). Esta sal de tetrazolio es un indicador de actividad deshidrogenasa al dar un cambio de color como resultado de su reducción por los electrones generados en la oxidación del BaP en forma de NADH (Ishiyama y col., 1997).

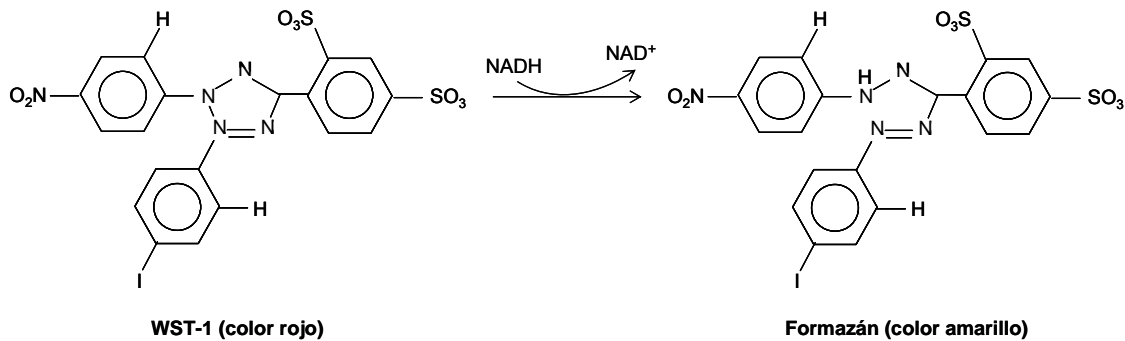


Figura 6.7 Reacción de reducción del WST-1 por acción de deshidrogenasa

6.6.1 Actividad deshidrogenasa en la biodegradación de compuestos hidrosolubles

En la Figura 6.8 se presentan las cinéticas de actividad deshidrogenasa, expresada en NADH ($\mu\text{mol mL}^{-1}$), por *A. terreus* en presencia de los extractos acuosos procedentes de los cultivos sólido con agrolita y líquido.

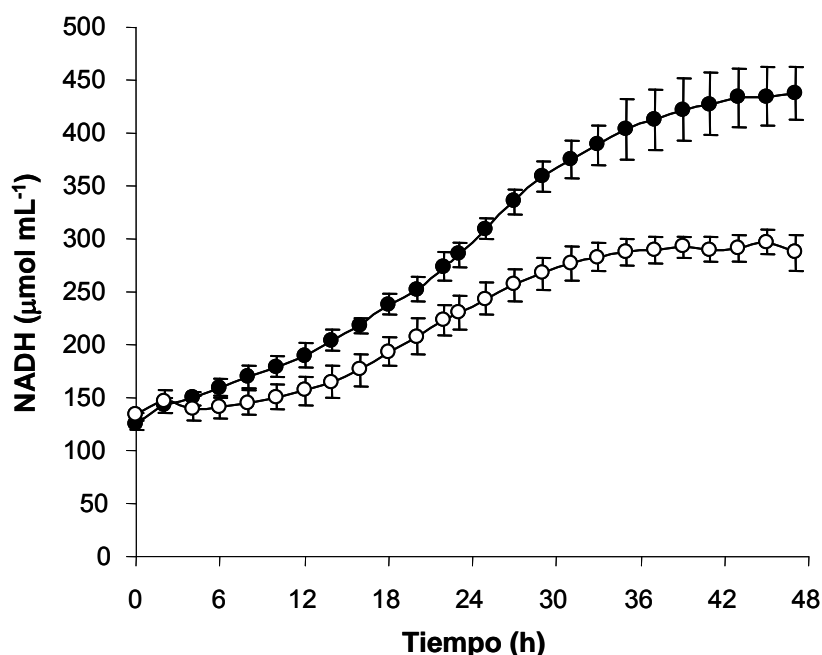


Figura 6.8 Cinética de actividad deshidrogenasa de los extractos acuosos de cultivo sólido en agrolita (círculos negros) y cultivo líquido (círculos blancos)

La actividad deshidrogenasa de los cultivos sólidos fue significativamente mayor que la actividad de los cultivos líquidos, obteniéndose una tasa de reacción máxima de 14.56 y 11.07 $\mu\text{mol NADH mL}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente en la sección 6.5, en donde se observó una mayor biodegradación de compuestos del cultivo sólido con agrolita con respecto a la biodegradación de los compuestos del cultivo líquido.

La mayor actividad deshidrogenasa encontrada para los compuestos provenientes del cultivo sólido con agrolita, se presentó entre las 6 horas y 36 horas de cultivo, mientras que, con los extractos del cultivo líquido la máxima actividad se observó entre las 8 y 26 horas para cultivo sólido. La diferencia entre ambas actividades sugiere la presencia de mayor cantidad de compuestos metabolizables en los extractos del cultivo sólido, con respecto a los del cultivo líquido, en donde la disminución en la actividad pudo ser consecuencia de la inhibición de la dihidrodiol deshidrogenasa por *o*-quininas (Penning, 1993). Existen reportes sobre la producción de quinonas como resultado de la biodegradación de BaP por hongos del

género *Aspergillus* que refuerzan esta hipótesis. Datta y Samanta (1988), reportaron la producción de 1,6-benzo(a)pirenoquinona y 3,6-benzo(a)pirenoquinona por *A. ochraceus* en cultivo líquido en presencia de 0.10 mg mL^{-1} de BaP.

Por otro lado, Meulenberg y col. (1997), encontraron que el 9-hidroxifenantreno y la 9,10-fenantrenquinona, compuestos producto de la biodegradación del fenantreno, no fueron biodegradados debido a una inhibición en el metabolismo de este HAP. Posiblemente, la presencia de compuestos como las quinonas inhibieron la biodegradación del BaP por *A. terreus*. Con el objetivo conocer si la concentración inicial de BaP en el medio de cultivo influye en la actividad deshidrogenasa, se realizó el análisis de la actividad deshidrogenasa de este hongo en presencia de diversas concentraciones de BaP como única fuente de carbono.

6.6.2 Efecto de la concentración inicial de BaP en la actividad deshidrogenasa

Este experimento se llevó a cabo en presencia de 0.001, 0.01, 0.025, 0.05, 0.12, 0.18, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50 y 5.00 mg BaP mL^{-1} . En la Figura 6.9 se presentan las cinéticas de actividad obtenidas para tres concentraciones iniciales: 0.01, 0.05 y 0.5 mg BaP mL^{-1} , seleccionadas como modelo para ejemplificar el comportamiento de actividad.

A partir de las cinéticas de actividad deshidrogenasa con distintas concentraciones iniciales de BaP, se obtuvieron las tasas de actividad, mediante la obtención de la pendiente en la fase exponencial de la curva al ajustar un modelo lineal ($R \geq 0.99$).

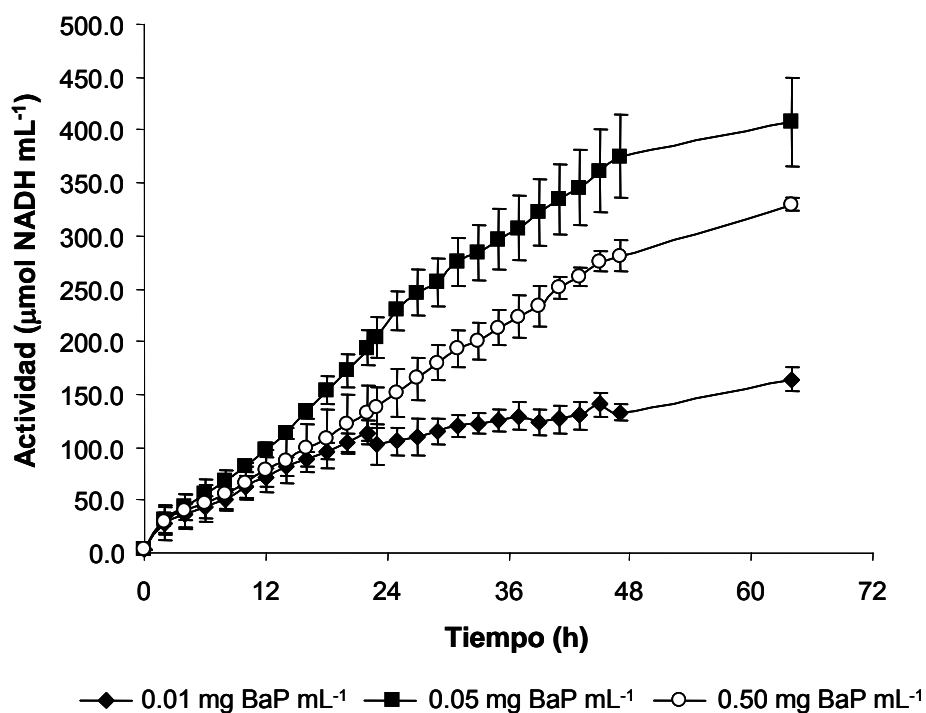


Figura 6.9 Cinética de actividad deshidrogenasa de *A. terreus* en cultivo líquido con diferentes concentraciones iniciales de BaP

Las tasas de actividad deshidrogenasa se graficaron con respecto a la concentración de BaP (Figura 6.10), encontrándose la máxima actividad entre 0.05 y 0.12 mg BaP mL⁻¹, a partir de esta concentración la actividad disminuyó, sin encontrarse una inhibición total de la misma. Cabe mencionar que a la actividad enzimática encontrada en los cultivos fue corregida con la encontrada en los cultivos en ausencia de BaP.

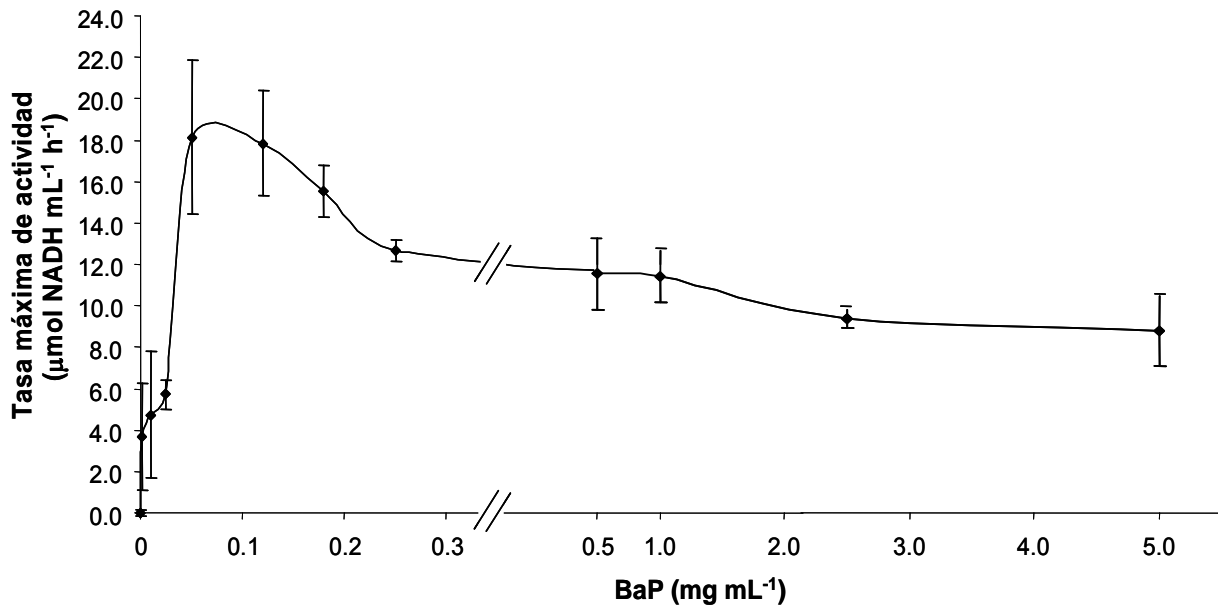


Figura 6.10 Tasas de actividad deshidrogenasa a diferentes concentraciones iniciales de BaP después de 64 horas de cultivo

La baja actividad obtenida en la biodegradación de las concentraciones menores (0.001 a 0.04 mg BaP mL⁻¹), puede estar relacionada con la baja concentración de carbono metabolizable del BaP. Por otro lado, la disminución de la actividad a partir de 0.25 mg BaP mL⁻¹ sugiere la acumulación de compuestos inhibitorios, cuya producción fue dependiente de la concentración. Concentraciones mayores de 0.25 mg BaP mL⁻¹ la producción de estos compuestos fue independiente de la concentración inicial.

6.6.3 Conclusiones parciales

Se encontró una mayor actividad deshidrogenasa en *A. terreus* en presencia de los compuestos hidrosolubles provenientes del cultivo sólido con agrolita, con respecto a los cultivos líquidos. Existe una diferencia metabólica en la biodegradación de BaP dependiente del tipo de cultivo; en los cultivos sólidos los compuestos hidrosolubles producto de la oxidación parcial del BaP son más metabolizables que los producidos en cultivo líquido.

La actividad deshidrogenasa de *A. terreus* en microcultivos con diferentes concentraciones de BaP, demostró que la producción de compuestos inhibitorios es dependiente de la concentración inicial. Dentro de un intervalo de concentración, después de 0.25 mg BaP mL⁻¹ no hubo cambios significativos en la actividad enzimática indicando que a partir de esta concentración la producción de los compuestos inhibitorios son independientes de la concentración.

7 CONCLUSIONES GENERALES

En cultivo sólido con espuma de poliuretano *Aspergillus terreus* biodegradó la mayor concentración de benzo(a)pireno (75%) en ausencia de glucosa y a C/N de 5 y 15. La biodegradación de benzo(a)pireno por *Phanerochaete chrysosporium* (63%) fue similar a la obtenida con *A. terreus*, pero no se modificó por la presencia de glucosa ni por las diferentes relaciones C/N. *Aspergillus niger* biodegradó la menor concentración de BaP a pesar del incremento en la biodegradación por la presencia de glucosa (54%).

La espuma de poliuretano aportó compuestos carbonados que interfirieron el estudio de la biodegradación de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía. La agrolita fue un buen soporte para este estudio. En cultivo sólido con espuma de poliuretano *Aspergillus terreus* biodegradó el doble con respecto a la biodegradación en cultivo sólido con agrolita (30%), obteniéndose como productos de biodegradación bajas concentraciones de CO₂ (6.5 del carbono consumido) y biomasa (14.5% del carbono consumido), y altas concentraciones de compuestos hidrosolubles (73% del carbono consumido).

En cultivo líquido la biodegradación de benzo(a)pireno como única fuente de carbono por *Aspergillus terreus* (12%) fue significativamente menor a la encontrada en cultivo sólido. La presencia de glucosa incrementó la biodegradación hasta niveles similares a los encontrados en los cultivos con agrolita (26%). Se obtuvo una alta producción de compuestos hidrosolubles (69% del carbono consumido) y baja producción de CO₂ (17% del carbono consumido) y biomasa (8% del carbono consumido).

La biodegradación de benzo(a)pireno en cultivo sólido y cultivo líquido por *Aspergillus terreus*, generó compuestos hidrosolubles que inhibieron la

biodegradación del BaP. La actividad deshidrogenasa presentada por *Aspergillus terreus* indicó que a 50 mg BaP mL⁻¹ se obtiene la máxima actividad del hongo, sin embargo, a concentraciones mayores la presencia del BaP no inhibió su actividad.

La actividad deshidrogenasa presentada por *Aspergillus terreus*, en el consumo de los compuestos solubles a partir de la biodegradación de benzo(a)pireno en cultivo sólido, fue significativamente mayor con respecto a los del cultivo líquido. Las condiciones de cultivo utilizado en la biodegradación de benzo(a)pireno fue un factor importante en la producción y consumo de los compuestos hidrosolubles, los cuales fueron parcialmente biodegradados.

Con los resultados de este estudio se demostró que la biodegradación de benzo(a)pireno por *Aspergillus terreus* se llevó a cabo como única fuente de carbono y energía en cultivo sólido y en cultivo líquido. La biodegradación de benzo(a)pireno generó compuestos hidrosolubles como principal producto metabólico. Este es el primer reporte sobre la biodegradación de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía por *Aspergillus terreus* en cultivo sólido y cultivo líquido.

8 RECOMENDACIONES

Algunas recomendaciones para estudios relacionados con este trabajo son:

Aislar e identificar los compuestos solubles en agua para la comprensión de la ruta metabólica de biodegradación de benzo(a)pireno por *A. terreus* en cultivo sólido y en cultivo líquido.

Determinar actividades enzimáticas como la monoxigenasa del citocromo P450, presentes en la biodegradación de benzo(a)pireno por *A. terreus* en cultivo sólido y líquido.

Estudiar el transporte de benzo(a)pireno del medio de cultivo al interior de las células.

Evaluar la biodegradación de benzo(a)pireno en un cultivo de *A. terreus* enriquecido con bacterias.

Evaluar la biodegradación de benzo(a)pireno por *A. terreus* en un sistema con suelo contaminado.

Aplicar el método colorimétrico de la actividad deshidrogenasa para la selección de microorganismos potencialmente biodegradadores de benzo(a)pireno e hidrocarburos aromáticos policíclicos y para evaluar el grado de inhibición de los compuestos de la oxidación parcial de estos compuestos.

9 REFERENCIAS

- Abarca, ML. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol.* 17: S79-S84
- Aitken, MD., Stringfellow, WT., Nagel, RD., Kazunga, C. y Chen, SH. 1998. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol.* 44: 743-752
- Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, New York
- Alkan, M., Karadas, M., Dogan, M. y Demirbas, Ö. 2005. Adsorption of CTAB onto perlite samples from aqueous solutions. *J Colloid Interface Sci.* 291: 309-318
- Amagai, T., Takahashi, Y., Matsushita, H., Morknoy, D., Sukasem, P. y Tabucanon, M. 1999. A survey on polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang-Mai, Thailand. *Environ Int.* 25: 563-572
- Amezcuca-Allieri, MA., Lead, JR., Meléndez-Estrada, J. y Rodríguez-Vázquez, R. 2003. Phenanthrene removal in a selected Mexican soil by the fungus *Penicillium frequentans*: role of C:N ratio and water content. *Soil Sediment Contam.* 12(3): 387-399
- April, TM., Foght, JM. y Currah, RS. 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol.* 46: 38-49
- Atlas, RM. y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y Ecología ambiental. Addison Wesley Longman, Inc. 4ta edición. España
- Bamforth, SM. y Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol.* 80: 723-736
- Barcan, V., Kovnatsky, E. y Shylina, A. 2000. Benzo(a)pyrene in soils and berries in an area affected by jets over the Kola Peninsula. *Atmos Environ.* 34: 1225-1231
- Barclay, CD., Farquhar, GF. y Legge, RL. 1995. Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 42: 958-963
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, PP., Freeman, JP. y Cerniglia, CE. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2554-2559
- Bezalel, L., Hadar, Y. y Cerniglia, CE. 1996a. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungi *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 62(1): 292-295

- Bezalel, L., Hadar, Y. y Cerniglia, CE. 1997. Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 63: 2495-2501
- Bogan, BW. y Lamar, RT. 1995. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 61: 2631-2635
- Bogan, BW. y Lamar, RT. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol.* 62(5): 1597-1603
- Bogan, BW., Schoenike, B., Lamar, TR. y Cullen, D. 1996. Expresión of *lip* genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 3697-3703
- Bogan, BW., Schoenike, B., Lamar, TR. y Cullen, D. 1996a. Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2381-2386
- Boonchan, S., Britz, ML. y Stanley, GA. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol.* 66(3): 1007-1019
- Bouchez, M., Blanchet, D. y Vandecasteele, JP. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43: 156-164
- Bouchez, M., Blanchet, D. y Vandecasteele, JP. 1996. The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 45: 556-561
- Boyle, D., Wiesner, C. y Richardson, A. 1998. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. *Soil Biol Biochem.* 30: 873-882
- Bumpus, JA. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 55: 154-158
- Cannel, E. y Moo Young, M. 1980. Solis state fermentation. *Process Biochem.* 15: 2-7
- Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A., y 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
- Cerniglia, CE. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3: 351-368
- Cerniglia, CE. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol.* 4: 331-338

- Cerniglia, CE. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 19: 324:333
- Cerniglia, CE. y Gibson, DT. 1979. Oxidation of benzo(a)pirene by the filamentous fungi *Cunninghamella elegans*. *J Biol Chem.* 254: 12174-12180
- Cerniglia, CE. y Gibson, DT. 1980. Fungal oxidation of benzo(a)pyrene and (+/-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene. Evidence of the formation of a benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide. *J Biol Chem.* 255(1): 5159-5163
- Chen, SH. y Aitken, MD. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ Sci Technol.* 33: 435-439
- Cocchieri, RA, Arnese, A y Minucci, AM. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from Italian central Mediterranean coasts. *Mar Pollut Bull.* 21: 15-18
- Collins, JF., Brown, JP., Dawson, SV. y Marty, MA. 1991. Risk assessment for benzo(a)pyrene. *Regul Toxicol Pharm.* 13(2): 170-184
- Collins, PJ., Kotterman, MJJ., Field, JA. y Dobson, ADW. 1996. Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 4563-4567
- Colombo, JC., Cabello, M. y Arambarri, AM. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolitic fungi. *Environ Pollut.* 94: 355-362
- Couto, SR., Rivera, I., Muñoz, MR. y Sanromán, A. 2000. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolourise Poly R-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biores Technol.* 74: 159-164
- Couto, SR., Gundín, M., Lorenzo, M. y Sanromán, A. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Proc Biochem.* 38: 249-255
- da Silva, M., Umbuzeiro, GA., Pfenning, LH., Canhos, VP. y Esposito, E. 2003. Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges. *Soil Sediment Contam.* 12(3): 345-356
- Datta, D. y Samanta, TB. 1988. Effect of inducers on metabolism of benzo(a)pyrene *in vivo* and *in vitro*: analysis by high pressure liquid chromatography. *Biochem Biophys Res Commun.* 155: 493-502
- Díaz-Ramírez, IJ. 2000. Biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de una planta nativa de pantano. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, México
- Díaz-Ramírez, IJ., Ramírez-Saad, H., Gutiérrez-Rojas, M. and 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
- Dilly, O. 2003. Regulation of the respiratory quotient of soil microbiota by availability of nutrients. *FEMS Microbiol Ecol.* 24: 375-381
- Durand, F, Peters, LD y Livingstone, DR. 2002. Efect of intertidal compared to subtidal exposure on the uptake, loss and oxidative toxicity of water-born benzo(a)pyrene in the mantle and whole tissues of the mussel, *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res.* 54: 271-274
- Dzul-Puc, JD., Esparza-García, F., Barajas-Aceves, M. y Rodríguez-Vázquez, R. 2005. Benzo(a)pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere.* 58: 1-7
- Enciclopedia on-line de prevención de riesgos laborales, www.segulab.com
- Ferreira, MMC. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study. *Chemosphere.* 44: 125-146
- Fewson, CA. 1988. Biodegradation of xenobiotics and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Trends Biotechnol.* 6(7): 148-153
- Flowers, L., Ohnishi, ST. y Penning, TM. 1997. DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinonas: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling and *o*-semiquinone anion radicals. *Biochemistry.* 35: 13664-13672.
- Freeman, DJ. y Cattell, FCR. 1990. Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Technol.* 24: 1581-1585
- Gamlin, L y Price, B. 1988. Bonfires and brimstone. *New Scientist.* 1637 (11): 48-51
- Gardener,
- Ghosh, DK, Datta, A, Samanta, TB y Mishra, AK. 1983. Microsomal benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: assay and characterisation of the enzyme system. *Biochem Biophys Res Comm.* 113: 497-505
- Gibson, DT., Mahadevan, V., Jerina, DM, Yagi, H. y Yeh, HJC. 1975. Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacteria. *Science.* 189: 295-297
- Goldman, R., Enewold, L., Pellizzari, E., Beach, JB., Bowman, ED., Krishnan, SS. y Shields, PG. 2001. Smoking increase carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human long tissue. *Cancer Res.* 61: 6367-6371
- Guenther, T., Sack, U., Hofrichter, M. y Laetz, M. 1998. Oxidation of PAH and PAH-derivatives by fungal and plant oxidoreductases. *J Basic Microb.* 38: 113-122
- Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W. y Steinberg, C. 1999. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo(a)pyrene. *Aquat Toxicol.* 45: 147-158

- Hakil, M., Voisinet, F., Viniegra-González, G. y Augur, C. 1999. Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamarii*: effects of additional nitrogen sources. *Proc Biochem.* 35: 103-109
- Halsall, C.J., Barrie, L.A., Fellin, P., Muir, D.G.C., Billeck, B.N., Lockhart, L., Rovinsky, F.Ya., Kononov, E.Ya y Pastukhov, B. 1997. Spatial and temporal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the arctic atmosphere. *Environ Sci Technol.* 31: 3593-3599
- Harkov, R., Greenberg, A., Darack, F., Daisey, J.M. y Liroy, P.J. 1984. Summer time variations in polyaromatic hydrocarbons at four sites in New Jersey. *Environ Sci Technol.* 18: 287-291
- Hatzinger, P.B. y Alexander, M. 1995. Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability in anaerobic enrichments. *Environ Sci Technol.* 29: 537-545
- Hendrix, A.J., Pieters, H. y de Boer, J. 1998. Accumulation of metals, polycyclic (halogenated) aromatic hydrocarbons and biocides in zebra mussels and eel from Rhine and Meuse Rivers. *Environ Toxicol Chem.* 17: 1885-1898
- Holubar, P., Andofer, C. y Braun, R. 1999. Effects of nitrogen limitation on biofilm formation in a hydrocarbon-degrading trickle-bed filter. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 536-540
- Howard, G.T. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodet Biodegrad.* 49: 245-252
- Huis in't Veld, M.G.A., Werners, J., van Veen, J.J. y Doddema, H.J. 1995. Biological PAH degradation in dredged sludges. Bioremediation of Recalcitrant Organics. Battelle Press, Columbus, OH. 17-22
- Humason, A.W. y Gadbois, D.F. 1982. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in the New York Bight area. *Bull Environ Contam Toxicol.* 29: 645-650
- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y. y Ueno, K. 1997. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta.* 44: 1299-1305
- Johnsen, A.R., Bendixen, K. y Ulrich, K. 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2683-2689
- Joner, E.J., Corrige, S.C., Amellal, N. y Leyval, C. 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 34: 859-864
- Juhasz, A.L. y Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. *Int Biodeter Biodegr.* 45: 57-88

- Juhasz, AL., Britz, ML. y Stanley, GA. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene and dibenz(a,h)anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J Appl Microbiol.* 83: 189-198
- Juhasz, AL., Stanley, GA. y Brito, ML. 2002. Metabolite repression inhibits degradation of benzo(a)pyrene and dibenz(a,h)anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 28: 88-96
- Juhasz, AL., Britz, ML. y Stanley, GA. 2000a. Evaluation of a creosote-based medium for the growth and preparation of a PAH-degrading bacterial community for bioaugmentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 24: 277-284
- Kastner, M. Breuer-Jammali, M y Mahro, B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity and pH on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl Environ Microbiol.* 64: 359-362
- Kastner, M. y Mahro, B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44: 668-675
- Kipopoulou, AM., Manoli, E. y Samara, C. 1999. Bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables grown in an industrial area. *Environ Pollut.* 106: 369-380
- Kirk, TK. 1980. Physiology of lignin metabolism by white-rot fungi. Lignin biodegradation: microbiology, chemistry and potential applications. CRC Press, Florida, EUA. 2: 56-57
- Kirso, U. e Irha, N. 1998. Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotox Environ Safe.* 41: 83-89
- Kotterman, MJJ., Vis, EH. y Field, JA. 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo(a)pyrene by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl Environ Microbiol.* 64(8): 2853-2858
- Lau, KL., Tsang, YY. y Chiu, SW. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere.* 52: 1539-1546
- Launen, LA., Pinto, LJ., Wiebe, C., Kiehlmann, E. y Moore, MM. 1995. The oxidation of pyrene and benzo(a)pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Can J Microbiol.* 41: 477-488
- Launen, LA., Pinto, LJ. y Moore, MM. 1999. Optimization of pyrene oxidation by *Penicillium janthinellum* using response-surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 510-515
- Launen, LA., Pinto, LJ., Percival, PW., Lam, SFS. y Moore, MM. 2000. Pyrene is metabolized to bound residues by *Penicillium janthinellum* SFU403. *Biodegradation.* 11: 305-312

- Lee, ML., Novotny, MV. y Bartle, KD. 1981. Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Academic Press, New York
- Liao, WL., Tseng, DH., Tsai, YC. y Chang, SC. 1997. Microbial removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Wat Sci Tech.* 35(8): 255-264
- Liebeg, EW. y Citright, TJ. 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr.* 44: 55-64
- Liste, HH. y Alexander, M. 2000. Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere.* 40: 11-14
- Lowry, OH. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275
- Ma, LL., Chu, SG., Wang, XT., Cheng, HX., Liu, XF. y Xu, XB. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface soil from outskirts of Beijing, China. *Chemosphere.* 58: 1355-1363
- Majcherczyk, A., Johannes, C. y Hutterman, A. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by lacasse of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Tech.* 22(5): 335-341
- Margesin, R. y Schinner, F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 650-663
- Martens, R. y Zadrazil, F. 1998. Screening of white-rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Folia Microbiol.* 43(1): 97-103
- Mastrangelo, G., Radda, M. y Marzia, V. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Persp.* 104: 1166-1170
- May, R., Schroder, P. y Sandermann Jr., H. 1997. Ex-situ process for treating PAH-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ Sci Technol.* 31: 2626-2633
- McNally, DL., Mihelcic, JR. y Lueking, DR. 1998. Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. *Environ Sci Technol.* 32: 2633-2639
- Meador, JP., Stein, JE., Reichert, WL. y Varanasi, S. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organism. *Rev Environ Contam Toxicol.* 143: 79-165
- Meckenstock RU, Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, HH. y Schink, B. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl Environ Microbiol.* 66(7): 2743-2747

- Meharg, AA., Wright, J., Dyke, H. y Osborn, D. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dispersion and deposition to vegetation and soil following a large scale chemical fire. *Environ Pollut.* 99: 29-36
- Mester, T. y Tien, M. 2000. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the biodegradation of environmental pollutants. *Int Biodeter Biodegr.* 46(1): 51-59
- Meulenberg, R., Rijnaarts, HHM. y Doddema, HJ. 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiol Lett.* 152: 45-49
- Moody, JD., Freeman, JP., Fu, PP. y Cerniglia, CE. 2004. Degradation of benzo(a)pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Environ Microbiol.* 70(1): 340-345
- Morozova, EV., Kozlov, VP., Tereshina, VM., Memorskaya, AS. y Feofilova, EP. 2002. Changes in lipid composition and carbohydrate composition of *Aspergillus niger* conidia during germination. *Appl Biochem Microbiol.* 38: 129-133
- Mueller, JG., Chapman, PJ. y Pritchard, PH. 1990. Action of a fluoranthene-utilising bacteria community on polycyclic aromatic hydrocarbon component of creosote. *Appl Environ Microbiol.* 55: 3085-3090
- Murado, MA., González, MP., Torrado, A. y Pastrana, LM. 1997. Amylase production by solid state cultures of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Proc Biochem.* 32(1): 35-42
- Nielsen, J., Villadsen, J. y Lidén, G. 2003. Bioreaction Engineering Principles. Kluwer Academic / Plenum Publishers. Nueva York. 56
- Ohkouchi, N., Kawamura, K. y Kawahata, H. 1999. Distributions of three to seven-ring polynuclear aromatic hydrocarbons on the deep sea floor in the central pacific. *Environ Sci Technol.* 33: 3086-3090
- Omura, T. 1999. Forty years of Cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun.* 266: 690-698
- Pagga, U. 1997. Testing biodegradability with standardized methods. *Chemosphere.* 35: 2953-2972
- Paine, MD., Chapman, PM., Allard, PJ., Murdoch, MH. y Minifie, D. 1996. Limited bioavailability of sediment polycyclic aromatic hydrocarbons near an aluminum smelter: contamination does not equal effects. *Environ Toxicol Chem.* 15(1): 2003-2018
- Pannu, JK., Singh, A. y Ward, OP. 2003. Influence of peanut oil on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol.* 49: 508-513
- Penning, TM. 1993. Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chem-Biol Interact.* 89: 1-34
- Peralta-Pérez, MR. 2001. Obtención y caracterización de un soporte modelo para el

estudio del metabolismo de hongos filamentosos degradadores de fenantreno. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, México

Phillips, DH. 1983. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Science*. 303: 468-472

Pickard, MA., Roman, R., Tinoco, R. y Vasquez-Duhalt, R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corilopsis gallica* UAMH 8260 lacasse. *Appl Environ Microbiol*. 65(9): 3805-3809

Pintado, J., Torrado, A., González, MP. y Murado, MA. 1998. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. *Enz Microb Technol*. 23: 149-156

Pothuluri, JV., Evans, FE., Heinze, TM. y Cerniglia, CE. 1996. Formation of sulfate and glucoside conjugates of benzo(e)pyrene by *Cunninghamella elegans*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 45: 677-683

Potin, O., Rafia, C. y Veignie, E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int Biodeter Biodegr*. 54: 45-52

Providenti, MA., Lee, H. y Trevors, JT. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J Ind Microbiol*. 12(6): 379-395

Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Elect J Biotechnol*. 1(3): 174-188

Rama-Mercier, R., Mougin, C., Sigoillot, JC., Sohier, L., Chaplain, V. y Asther, M. 1998. Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol Tech*. 12(10): 725-728

Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L. y Steiman, R. 2000. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*. 40: 557-563

Rockne, KJ. y Strand, SE. 1998. Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. *Environ Sci Technol*. 32: 2962-2967

Rodríguez-Vázquez, R., Moltalvo P, C., Dendooven, L., Esparza G, F. y Fernández L, L. 1999. Degradation of Benzo(a)pyrene by white rot fungi. *Biorremediation Technologies for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds*. Battelle Press. 5(8): 93-98

Romero, MC., Salvioli, ML., Cazau, MC. y Arambarri, AM. 2002. Pyrene degradation by yeast and filamentous fungi. *Environ Pollut*. 117: 159-163

Rouliá, M., Chassapis, K., Fotinopoulos, CH. Savvidis, TH. y Katakis, D. 2003. Dispersion and sorption of oil spills by emulsifier-modified expanded perlite. *Spill Sci Technol Bull*. 8(5-6): 425-431

Sack, U., Heinze, TM., Deck, J., Cerniglia, CE., Martens, R., Zadrazil, F. y Fritsche W. 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl Environ Microbiol*. 63: 3919-3925

- Samanta, SK., Singh, OV. y Jain, RK. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20(6): 243-248
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W. y Warshawsky, D. 1996. Degradation of pyrene, benz(a)anthracene and benzo(a)pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl Environ Microbiol.* 62: 13-19
- Semple, KT., Morriss, WJ. y Paton, GI. 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur J Soil Sci.* 54: 809-818
- Shiaris, M.P. 1989. Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene and benzo(a)pyrene in surficial estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol.* 55:1391-1399
- Siron, R., Pelletier, E. y Brochu, H. 1995. Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Arch Environ Contam Toxicol.* 28: 406-416
- Sirota, RG., Uthe, JF., Sreedharan, A., Matheson, R., Musial, CJ. y Hamilton, K. 1993. Polynuclear aromatic hydrocarbons in lobster (*Homarus americanus*) and sediments in the vicinity of coking facility. Polynuclear aromatic hydrocarbons: formation, metabolism and measurement. Battelle Press, Columbus, OH. 1123-1136
- Song, H-G. 1999. Comparison of pyrene biodegradation by white rot fungi. *World J Microbiol Biotechnol.* 15: 669-672
- Staci, L., Simonich, SL. y Hites, RA. 1994. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Technol.* 28: 939-943
- Steffen, KT., Hatakka, A. y Hofrichter, M. 2002. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60: 212-217
- Stringfellow, WT. y Alvarez-Cohen, L. 1999. Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. *Wat Res.* 33(11): 2535-2544
- Strongkhost, J., Vos, PC. y Misdorp, R. 1994. Trace metals, PBCs and PAHs in benthic (epibenthic) diatoms from intertidal sediments: a pilot study. *Bull Environ Contam Toxicol.* 61: 818-824
- Sutherland, JB. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J Ind Microbiol.* 9: 53-62
- Sutherland, JB., Fu, PP., Yang, SK., Von Tungeln, LS., Casillas, RP., Crow, SA. y Cerniglia, CE. 1993. Enantiomeric composition of the *trans*-dihydrodiols produced from phenanthrene by fungi. *Appl Environ Microbiol.* 59: 2145-2149

- Sutherland, JB., Rafic, F., Khan, AA. y Cerniglia, CE. 1995. Mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbons degradation, Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Wiley-Liss, Nueva York
- Suzuki, T. y Yamaya, S. 2005. Removal of hydrocarbons in a rotating biological contactor with biodrum. *Proc Biochem.* 40: 3429-3433
- Tao, S., Cui, YH., Xu, FL., Li, BG., Cao, J., Liu, WX., Schmitt, G., Wang, XL., Shen, WR., Qing, BP. y Sun, R. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *Sci Total Environ.* 320(1): 11-24
- Tekere, M., Read, JS. y Mattiasson, B. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi. *J Biotechnol.* 115: 367-377
- Trapp, S., Matthies, M., Scheunert, I. y Topp, EM. 1990. Modeling the bioconcentration of organic chemicals in plants. *Environ Sci Technol.* 24: 1246-1252
- Trinder, P. 1964. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem.* 6: 24-29
- Valerio, F., Piccardo, MT. y Grasso, E. 2000. Precision of benzo(a)pyrene (BaP) analysis in mussel tissue. *Mar Pollut Bull.* 40(6): 551-554
- van de Langemaat, J. y Pyle, DL. 2001. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chem Eng J.* 84: 115-123
- Vanrooij, JGM., Bodelierbade, MM. y Jongeneelen, FJ. 1993. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic-hydrocarbons in 12 coke-oven workers. *Brit J Ind Med.* 50: 623-632
- Veignie, E., Rafin, C., Woisel, P., Lounes-Hagj Sahraoui, A. y Cazier, F. 2002. Metabolization of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo(a)pirene by a non-white rot fungus (*Fusarium solani*) in a batch reactor. *Polycycl Aromat Comp.* 22: 87-97
- Venkateswarlu, K., Marsh, RM., Faber, B. y Nelly, SL. 1996. Investigation of cytochrome P450 mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in *Aspergillus fumigatus*. *J Chem Technol Biotechnol.* 66: 139-144
- Verdin, A., Sahraoui, ALH. y Durand, R. 2004. Degradation of benzo(a)pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *Int Biodeter Biodegr.* 53: 65-70
- Viniegra-González, G. 1997. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. Basic aspects and parameters measurements. Advances in solid state fermentation. Kluwer Academic Publishers. 5-22
- Vo-Dinh, T., Griffin, GD., Alarie, JP., Cullum, B., Sumpter, B. y Noid, D. 2000. Development of nanosensors and bioprobes. *J Nanopart Res.* 2: 17-27
- Volke-Sepúlveda, TL., Gutiérrez-Rojas, M. and Favela-Torres, E. 2003. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus*

niger. *Biores Technol.* 87: 81-86

Volke-Sepúlveda, TL., Gutiérrez-Rojas, M. and Favela-Torres, E. 2005. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Biores Technol.* En prensa

Wagrowski, DM. y Hites, RA. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban and rural vegetation. *Environ Sci Technol.* 31: 279-282

Walter, U., Beyer, M., Klein, J. y Rehm, HJ. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34: 671-676

Wilcke, W., Müller, S., Kanchanakool, N., Niamskul, C. y Zech, W. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in hydromorphic soils or the tropical metrópolis Bangkok. *Geoderma.* 91: 297-309

Wilcke, W. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil – a review. *J Plant Nutr Soil Sci.* 163: 229-248

Wilson, SC. y Jones, KC. 1993. Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut.* 81: 229-249

Wolter, M., Zadrazil, F., Martens, R. y Bahadir, M. 1997. Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus* sp. Florida in solid wheat straw substrate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 48: 398-404

Wunch, KG., Feibelman, T. y Bennett, JW. 1997. Screening for fungi capable of removing benzo(a)pyrene in culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47: 620-624

Wunder, T., Marr, J., Kremer, S., Sterner, O. y Anke, H. 1997. 1-Methoxypyrene and 1,6-dimethoxypyrene: two novel metabolites in fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Microbiol.* 167: 310-316

Ye, B., Siddiqi, MA., Maccubin, AE., Kumar, S. y Sikka, HC. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ Sci Technol.* 30: 136-142

Yuan, SY., Wei, SH. y Chang, BV. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere.* 41: 1463-1468

Yuan, SY., Chang, JS., Yen, JH. y Chang, BV. 2001. Biodegradation of phenanthrene in river sediments. *Chemosphere.* 43: 273-278

Zander, M. 1983. Physical and chemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons, Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. Merceel Dekker, Inc. New York

Zheng, Z. y Obbard, JP. 2002. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb Tech.* 31: 3-9

Zitrides, TG. 1978. Mutant bacteria overcome growth inhibition in industrial waste facility. *Ind Waste.* 24: 42-44

APENDICE I Hoja de datos de seguridad del benzo(a)pireno

(Enciclopedia on-line de prevención de riesgos laborales)

Número CAS

50-32-8

SARA 313

Si

Fórmula

C₂₀H₁₂

Sinónimos

Benzo(d,e,f)criseno; 3,4-benzopireno; 6,7-benzopireno; Benz(a)pireno; BP; BaP; 3,4-BP

Aspecto físico

Polvo o cristales amarillo pálido
Inodoro

Peligros químicos

Reacciona con nitroderivados y oxidantes fuertes

Identificación de riesgos

Instrucciones de urgencia

Tóxico peligroso para el medio ambiente
Puede causar cáncer
Riesgo durante el embarazo de efectos adversos sobre el feto
Puede provocar alteraciones genéticas hereditarias
Puede hacer disminuir la fertilidad
Órganos diana: piel y pulmones

Clasificación HMIS (Health Management Information System)

Salud: 2 (puede ocurrir daño temporal o menor)
Inflamabilidad: 0
Reactividad: 0

Clasificación NFPA (National Fire Protection Association)

Salud: 2 (peligros crónicos adicionales presentes)
Inflamabilidad: 0
Reactividad: 0

Primeros auxilios

Exposición oral

En caso de ingestión, lavar la boca con agua
Si el sujeto está inconsciente llamar al médico

Inhalación

En caso de inhalación, sacar al sujeto al aire libre
Si no respira, administrar respiración artificial
Si respira con dificultad, administrar oxígeno

Exposición dérmica

En caso de contacto con la piel, lavar con abundante cantidad de agua durante 15 minutos por lo menos
Quitar la ropa y el calzado contaminados
Llamar al médico

Exposición ocular

En caso de contacto con los ojos, enjuagar con abundante cantidad de agua durante 15 minutos por lo menos
Separar los párpados con los dedos para asegurar un buen enjuague de los ojos
Llamar al médico

Medidas en caso de incendio

Punto de destello

No determinado

Temperatura de autoignición

No determinado

Inflamabilidad

No determinado

Medios de extinción

Adecuado: dióxido de carbono, polvo químico seco o espuma apropiada

Contra incendios

Equipo de protección: usar un aparato respiratorio autónomo y ropa protectora para evitar el contacto con la piel y los ojos
Riesgos específicos: emite humos tóxicos

Medidas en caso de accidente

Procedimiento a seguir en caso de fuga o vertido

Evacuar la zona

Procedimientos de precaución personal

Usar un aparato respiratorio autónomo, botas de goma y guantes de goma fuertes

Usar batas desechables para destruir después del uso

Métodos de limpieza

Barrer, meter en una bolsa y conservar para su posterior eliminación

Evitar el levantamiento de polvo

Ventilar el local y lavar el lugar donde se haya derramado una vez retirado por completo

Instrucciones de manipulación y almacenamiento

Manipulación

Exposición del usuario: no inhalar el polvo

No permitir el contacto con los ojos, la piel y la ropa

Evitar la exposición prolongada o repetida

Almacenamiento

Adecuado: mantener herméticamente cerrado

Controles de exposición /PPE

Controles de ingeniería

Utilizar solamente dentro de una cabina de humos químicos

Ducha de seguridad y baño ocular

Equipos de protección personal

Respiratorio: aparato respirador aprobado por NIOSH/MSHA

Manos: guantes compatibles resistentes a los productos químicos

Ojos: gafas protectoras contra productos químicos

Medidas generales de higiene

Lavar la ropa contaminada antes de volverla a usar

Lavarse cuidadosamente después de la manipulación

Estabilidad y reactividad

Estabilidad

Estable

Materiales a evitar: agentes extremadamente oxidantes

Productos de descomposición peligrosos

Monóxido de carbono y dióxido de carbono

Polimerización peligrosa

No se producirá

Información toxicológica

Vía de exposición

Contacto con la piel: puede provocar irritación de la piel

Absorción cutánea: puede ser nocivo

Contacto con los ojos: puede provocar irritación de los ojos

Inhalación: puede ser irritante para las membranas mucosas y el tracto respiratorio. Puede ser nocivo en caso de inhalación

Ingestión: puede ser nocivo

Sensibilización

Provoca dermatitis

Órganos o sistemas diana

Piel y pulmones

Signos y síntomas de la exposición

Entre los síntomas de exposición puede figurar quemazón, tos, sibilancia, laringitis, respiración jadeante, cefalea, náuseas y vómitos

Cancerígeno

Por exposición crónica

Este producto es probablemente cancerígeno en humanos, según determinado basado en su clasificación por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), la Agencia de Seguridad e Higiene del Trabajo (OSHA), la Conferencia de Higienistas Industriales Gubernamentales de los Estados Unidos (ACGIH), el Programa Nacional de Toxicología (NTP) y la Agencia para la Protección del Ambiente (US-EPA)

Teratógeno

Por exposición crónica

Puede provocar malformación congénita en el feto

Mutagénico

Por exposición crónica

Puede provocar alteraciones genéticas

Riesgo reproductor

Por exposición crónica

Puede provocar trastornos del aparato reproductor

Consideraciones sobre el deshecho

Método adecuado para el deshecho

Para la eliminación, dirigirse a un servicio profesional autorizado

Disolver o mezclar con solvente combustible y quemarlo en un incinerados
apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador

Observar todos los riesgos estatales y locales sobre la protección del medio
ambiente

APENDICE II Hoja de datos de seguridad del diclorometano

(Enciclopedia on-line de prevención de riesgos laborales)

Número CAS

75-09-2

SARA 313

Si

Fórmula

CH₂Cl₂

Sinónimos

Cloruro de metileno, Dicloruro de metilo, DCM

Aspecto físico

Líquido incoloro

Olor característico

Peligros químicos

En contacto con superficies calientes o con llamas esta sustancia se descompone formando humos tóxicos y corrosivos. Reacciona violentamente con metales tales como aluminio, magnesio, sodio, potasio y litio, bases y oxidantes fuertes, originando peligro de incendio y explosión. Ataca algunas formas de plástico, caucho y recubrimientos

Propiedades físico químicas

Peso molecular

84.9

Punto de ebullición

40 °C

Punto de fusión

-95.1 °C

Densidad relativa

1.3

Solubilidad en agua (g 100 mL⁻¹ a 20 °C)

1.3

Presión de vapor (a 20 °C)

47.4 KPa

Densidad relativa de vapor (aire=1)

2.9

Coefficiente de partición octanol:agua (Log K_{ow})

1.25

Identificación de riesgos

Instrucciones de urgencia

Muy peligroso en caso de contacto con los ojos (irritante), ingestión o inhalación

Poco peligroso en caso de contacto con la piel (irritante)

Una exposición muy prolongada puede causar la muerte

Puede ser fatal en caso de ingestión o inhalación

Puede irritar la piel y los ojos

Inflamación de los ojos es caracterizada por enrojecimiento, lagrimeo y escozor

Órganos diana: pulmones, sistema nervioso, hígado y membranas mucosas

Clasificación HMIS (Health Management Information System)

Salud: 2 (puede ocurrir daño temporal o menor)

Inflamabilidad: 1 (materiales que deben ser precalentados antes de la ignición)

Reactividad: 0

Clasificación NFPA (National Fire Protection Association)

Salud: 2 (peligros crónicos adicionales presentes)

Inflamabilidad: 1 (materiales que deben ser precalentados antes de la ignición)

Reactividad: 0

Primeros auxilios

Exposición oral

En caso de ingestión, lavar la boca con agua

Tomar grandes cantidades de agua o leche

Inducir el vómito

Buscar ayuda médica inmediatamente

Inhalación

En caso de inhalación, sacar al sujeto al aire libre
Buscar ayuda médica inmediatamente
Si se trata de inhalación seria:
Sacar al sujeto a un área ventilada lo antes posible
Aflojar la ropa ajustada, como cinturones, corbatas, collares
Si no respira, administrar respiración artificial, precaución con la respiración boca a boca
Si respira con dificultad, administrar oxígeno

Exposición dérmica

En caso de contacto con la piel, lavar con abundante cantidad de agua fría y jabón durante 15 minutos por lo menos
Prestar especial atención a los dobleces de brazos y piernas, arrugas o pliegues de la piel y las ingles
Quitar la ropa y el calzado contaminados
Si la irritación persiste llamar a un médico
Lavar la ropa contaminada antes de usar
En caso de una exposición cutánea seria utilizar jabón desinfectante, cubrir la herida con crema antibacterial y buscar ayuda médica inmediatamente

Exposición ocular

En caso de contacto con los ojos, enjuagar con abundante cantidad de agua durante 15 minutos por lo menos
Separar los párpados con los dedos para asegurar un buen enjuague de los ojos
Debe utilizarse agua fría
No se utilizar ungüento para ojos
Llamar al médico

Medidas en caso de incendio

Punto de destello

No determinado

Temperatura de autoignición

640 °C

Límites de explosividad (% en volumen en el aire)

14 – 25%

Inflamabilidad

Combustible

Medios de extinción

Adecuado: dióxido de carbono, polvo químico seco, agua o espuma

Contra incendios

Equipo de protección: usar un aparato respiratorio autónomo y ropa protectora para evitar el contacto con la piel y los ojos

Riesgos específicos: emite humos tóxicos

Medidas en caso de accidente

Procedimiento a seguir en caso de fuga o vertido

Evacuar la zona

Procedimientos de precaución personal

Usar un aparato respiratorio autónomo, botas de goma y guantes de goma fuertes

Usar batas desechables para destruir después del uso

Métodos de limpieza

Diluir con agua o trapear

Absorber con un material inerte y seco como arena y confinar en un contenedor apropiado

Ventilar el local y lavar el lugar donde se haya derramado una vez retirado por completo

Instrucciones de manipulación y almacenamiento

Manipulación

Exposición del usuario: no inhalar el polvo

No permitir el contacto con los ojos, la piel y la ropa

Evitar la exposición prolongada o repetida

Almacenamiento

Adecuado: mantener herméticamente cerrado, separado de metales, alimentos, alejado del fuego o lugares con riesgo de incendio.

Mantener en lugar fresco con ventilación

Controles de exposición /PPE

Controles de ingeniería

Utilizar solamente dentro de una cabina de extracción bien ventilada
Ducha de seguridad y baño ocular

Equipos de protección personal

Respiratorio: aparato respirador aprobado por NIOSH/MSHA
Manos: guantes compatibles resistentes a los productos químicos
Ojos: gafas protectoras contra productos químicos

Medidas generales de higiene

Lavar la ropa contaminada antes de volverla a usar
Lavarse cuidadosamente después de la manipulación

Estabilidad y reactividad

Estabilidad

Estable

Productos de descomposición peligrosos

Desprende gases tóxicos e irritantes

Polimerización peligrosa

No se producirá

Información toxicológica

Vía de exposición

Contacto con la piel: puede provocar irritación de la piel
Absorción cutánea: puede ser nocivo
Contacto con los ojos: puede provocar irritación de los ojos
Inhalación: puede ser irritante para las membranas mucosas y el tracto respiratorio. Puede ser nocivo en caso de inhalación
Ingestión: puede ser nocivo

Sensibilización

Provoca dermatitis, disminución de la consciencia

Órganos o sistemas diana

Pulmones, sistema nervioso, hígado y membranas mucosas

Signos y síntomas de la exposición

Entre los síntomas de exposición puede figurar vértigo, somnolencia, cefalea, pérdida del conocimiento, quemazón, enrojecimiento, piel seca, dolor abdominal

Cancerígeno

Por exposición crónica

Este producto es probablemente cancerígeno en humanos, según determinado basado en su clasificación por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y la Agencia de Seguridad e Higiene del Trabajo (OSHA)

Riesgo reproductor

No determinado

Consideraciones sobre el deshecho

Método adecuado para el deshecho

Para la eliminación, dirigirse a un servicio profesional autorizado

Reutilizar si es posible

Observar todos los riesgos estatales y locales sobre la protección del medio ambiente

APÉNDICE III Glosario

Actividad de agua. Medida de la cantidad de agua disponible reactiva disponible, equivalente a la humedad relativa

Anabolismo. Proceso metabólico en el cual se sintetizan las moléculas orgánicas más complejas a partir de otras más sencillas o de los nutrientes, con requerimientos de energía.

Antropogénica. Efectos producidos por las actividades humanas.

Biodegradabilidad. Es la característica de algunas sustancias químicas de poder ser utilizadas como sustrato por microorganismos que las emplean para producir energía y crear otras sustancias como aminoácidos, proteínas, etc.

Biodisponibilidad. Es el efecto de factores fisicoquímicos y microbiológicos en la tasa y el nivel de biodegradación (Cerniglia, 1992).

Carcinógeno. Un agente carcinógeno tanto físico, químico como biológico es aquél que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que produce cáncer. Generalmente, el término se refiere a aquellos agentes que han sido introducidos por el hombre, pero puede usarse para toda sustancia que tiende a causar cáncer.

Catabolismo. Proceso metabólico que consiste en la transformación de moléculas orgánicas o biomoléculas complejas en moléculas sencillas y en el almacenamiento de la energía química desprendida en forma de enlaces fosfato de moléculas de ATP, mediante la destrucción de las moléculas que contienen gran cantidad de energía en los enlaces covalentes que la forman.

Coefficiente de partición aire:agua (K_{AW}). K_{AW} es importante para el control de los ciclos de los compuestos en la interfase aire- agua y puede ser determinada mediante la medición de la concentración de soluto en ambas fases. $K_{AW} = H/RT$, donde R es la constante de los gases, T es la temperatura y H es la constante de la Ley de Henry.

Coefficiente de partición de carbono orgánico (K_{OC}). Para la mayoría de los compuestos no iónicos, el contenido de materia orgánica en el suelo es un factor determinante en su adsorción en este, haciendo al K_{OC} el parámetro más atizado para indicar la movilidad de los compuestos en sistemas de suelo-agua. Los compuestos con altos valores de $\log K_{OC}$ son menos móviles que aquellos que presentan bajos valores.

Coefficiente de partición octanol:agua (K_{OW}). Este parámetro describe la afinidad que tiene un compuesto por un medio acuoso o uno orgánico. Los compuestos que tienen $K_{OW} > 1$ son lipofílicos y aquellos con $K_{OW} < 1$ son hidrofílicos. Por definición, K_{OW} es inversamente proporcional a la solubilidad en agua.

Coefficiente de partición octanol:aire (K_{OA}). K_{OA} es un parámetro que describe la partición de los compuestos semivolátiles entre la atmósfera y las fases orgánicas, $K_{OA} = C_O/C_A$ donde C_O/C_A es la proporción de la concentración de soluto en octanol y la concentración en el aire.

Genotóxico. Las sustancias genotóxicas pueden unirse al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando, en consecuencia, mutaciones que pueden o no producir cáncer. Las sustancias genotóxicas no son necesariamente carcinógenas, pero la mayor parte de los carcinógenos son genotóxicos.

Inhibición. Disminución de la actividad enzimática a través de interacciones entre un inhibidor y el centro activo de la enzima u otros centros específicos.

Lignina. Es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogeneidad, utilizada en las paredes celulares de las plantas para crear madera. Es una macromolécula, con un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios aminoácidos y alcoholes fenilpropílicos.

Mutación. Cualquier cambio permanente en el ADN de una célula. Las mutaciones pueden deberse a errores en el proceso de división celular o a la exposición a

agentes presentes en el medioambiente y que puedan dañar el ADN. Ciertas mutaciones pueden causar cáncer u otras enfermedades.

Mutágeno. Sustancia o agente físico que causa mutaciones.

Pirólisis. Descomposición térmica de un material en ausencia de oxígeno o cualquier otro reactante. Esta descomposición se produce a través de una serie compleja de reacciones químicas y de procesos de transferencia de materia y calor.

Pirosíntesis. Recombinación de sustancias inestables para generar otros compuestos.

Recalcitrante. Producto químico totalmente resistente al ataque microbiano

Teratógeno. Sustancia que provoca malformaciones congénitas en el embrión o feto.

Tóxico. Sustancia que causa efectos adversos en los organismos expuestos, como resultado de interacciones fisicoquímicas con sus tejidos.

Iztapalapa, D.F. a 24 de Noviembre de 2005

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

“Biodegradación de altas concentraciones de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía por *Aspergillus terreus* en cultivo sólido”

PRESENTÓ

IBI Ana Luisa Bravo de la Garza

Director:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa



Jurado:

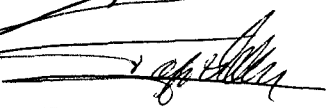
Dra. Araceli Tomasini Campocosio (Presidente)
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa



Dr. Ernesto Favela Torres (Secretario)
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa



Dra. Tania Volke Sepúlveda (Vocal)
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Dra. Inés García Peña (Vocal)
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología
Instituto Politécnico Nacional

