

5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA DEGRADACION DEL PENTAFLOROFENOL POR Rhizopus sp. EN CULTIVO SUMERGIDO

290999

T E S I S

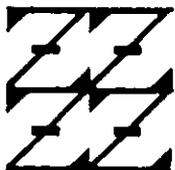
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ROSA MARIA BERNAL ENRIQUEZ

U N A M FES ZARAGOZA



DIRECTORA: DRA. ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO (UAMI) ASESOR INTERNO: M. en C. ENRIQUE MENDIETA MARQUEZ

MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 2000

LO HUMANO ES DE NUESTRA REFLEXION



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

## AGRADECIMIENTOS

---

A mi madre y hermano Luis que siempre esta conmigo siendo el móvil de mi vida y el ejemplo a seguir.

A mis hermanos : Tomás, Rodolfo Mario y Miguel  
A mis sobrinos: Ileri, Maricela, Aida y Alonso, gracias por su cariño y comprensión.

A mis amigos y compañeros que han formado parte de mi vida, a mis profesores que me enseñaron a ser una mejor persona.

A mi directora de Tesis: la Dra. Araceli Tomasini Campocosio por la enorme paciencia y comprensión que siempre me tuvo.

Al Biólogo: Marco Antonio Hernández Muños quien determino al *Rhizopus sp.* como *Rhizopus nigrican* en el Bioterio de la FES Zaragoza.

A la Bióloga: Maricela Arteaga Mejía que limpio Camino, quitando los obstáculos que no me permitían seguir avanzando.

## RESUMEN

Se identificó una cepa silvestre de *Rhizopus* como *R. nigricans* capaz de degradar el pentaclorofenol (PCF). Se probaron diferentes amortiguadores tales como carbonatos, acetatos y citratos, en el medio de cultivo con el fin de determinar con cuál de ellos se mantenía el pH y no se afectaba el crecimiento, siendo seleccionado el de citratos. Usando el medio Melin-Norkrans y el amortiguador de citratos se determinaron algunas condiciones de cultivo como la relación de C/N (18.9 y 36.46) la agitación (125 rpm, 65 rpm y sin agitación), para poder observar el papel que juegan el nitrógeno en la relación C/N y la agitación en el crecimiento y en la degradación del PCF. La mayor degradación del PCF fue del 80%, en los cultivos con una relación de 18.9 (C/N), a 125rpm. En estas condiciones se obtuvo una tasa de degradación específica de 0.029mg PCF/mg biom h.

## INDICE

	PAG.
INTRODUCCIÓN	5
1. PENTAFLOROFENOL (PCF)	7
1.1 PROPIEDADES FÍSICAS	8
1.2 PROPIEDADES QUÍMICAS	9
1.3 TABLA DE LA COMPOSICIÓN COMERCIAL DEL PCF	10
2. USOS	11
3. TOXICIDAD	11
3.1 EN ANIMALES	11
3.2 EN HUMANOS	12
4. MÉTODOS PARA LA DEGRADACIÓN DEL PCF	13
4.1 MÉTODOS FÍSICOS	13
4.2 MÉTODOS QUÍMICOS	14
4.3 MÉTODOS BIOLÓGICOS	14
5. DEGRADACIÓN POR HONGOS FILAMENTOSOS	16
6. RUTAS METABÓLICAS DE LA DEGRADACIÓN	16
7. BASIDIOMICETOS	17
8. ZIGOMICETOS	18
8.1 GENERO: <i>Rhizopus</i> EHRENBERG	19
8.2 CLAVES PARA LAS ESPECIES DEL GENERO <i>Rhizopus</i>	20
9. ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24

## INTRODUCCION

La contaminación es un problema alarmante a nivel mundial, lo que ha impulsado al hombre a buscar alternativas para la solución de la misma. En la parte central del país, los problemas ambientales más estudiados son la existencia de dioxinas en los ríos y la contaminación del aire, especialmente en el Distrito Federal. Los efectos del deterioro del medio ambiente en la ciudad de México cada vez son más percibidos por la ciudadanía, ya que por el incremento en los niveles de contaminación, especialmente en el aire, se ha incrementado la manifestación de daños en la salud de la población (SEMARNAP, 1994). Los constituyentes de los residuos peligrosos pueden disolverse o ser arrastrados por el agua, penetrar y difundirse a través de los suelos y alcanzar a los mantos freáticos y/o los acuíferos subterráneos, además pueden contaminar las aguas superficiales y transferirse a lo largo de la cadena alimentaria hasta llegar a los seres humanos (Wania y Makcay, 1996). Alrededor de 2000 compuestos clorados y otros halogenados son descargados en nuestra biósfera por plantas, organismos marinos, insectos, bacterias, hongos y mamíferos y por procesos naturales que ocurren en los océanos, en la atmósfera, y en el suelo contribuyendo a la formación de clorofenoles y otros compuestos clorados, incluyendo las dióxinas (Gribble, 1994)

Actualmente existen varios procesos para el tratamiento de aguas residuales y para eliminar la mayoría de los contaminantes; sin embargo hay ciertos compuestos tóxicos como los clorofenoles, los bifenilos policlorados, los derivados de hidrocarburos, etc. de difícil degradación. Los clorofenoles son compuestos tóxicos y muy persistentes en el ambiente, se ha demostrado que estos son más estables que otros fenoles sustituidos, observando que su grado de descomposición disminuye cuando el número de átomos de cloro se incrementa en el anillo fenólico.

Entre los clorofenoles se encuentra el pentaclorofenol (PCF) que se emplea en la industria maderera y en la producción de aceite mineral, entre otras aplicaciones, por lo que se encuentra en altas concentraciones en las aguas residuales de estas industrias y en suelos cercanos a ellas (Freiter, 1979). El PCF produce quemaduras en la piel e irritación en la nariz y garganta (Crosby, 1981).

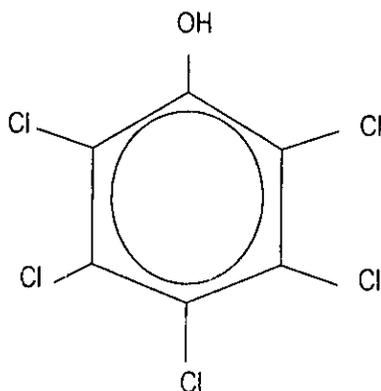
Desde hace varios años se han estado realizando estudios con diferentes microorganismos para determinar la capacidad de degradar al PCF; entre estos microorganismos estudiados se encuentran las bacterias (Hägglömb y col., 1988; Lin y col., 1989; Gu y Korus, 1995) y los hongos filamentosos, principalmente basidiomicetos de pudrición blanca (Cserjesi y Johnson, 1971; Mileski y col., 1988; Lin y col. op. cit. ). Estos hongos tienen la habilidad de degradar compuestos aromáticos; el más estudiado de ellos es el *Phanerochaete chrysosporium*, el cual mineraliza una amplia variedad de compuestos xenobióticos tóxicos, como el PCF (Reddy, 1995). Este hongo es capaz de agotar el PCF que se encuentra en el suelo, por lo que puede ser utilizado en la biorremediación de suelos contaminados con este tipo de compuestos.

Se han realizado estudios con otros hongos, tales como los zigomicetos, por ejemplo *Cunninghamella elegans* que ha sido empleado para degradar fluoranteno, acenafteno y ciertos hidrocarburos policíclicos aromáticos (Pothuluri y col., 1990 y Sutherland, 1992). En el laboratorio de Biotecnología de la UAM-I se aisló una cepa silvestre de *Rhizopus sp.*, a partir de efluentes de una industria del papel. Este hongo pertenece a los zigomicetos y se ha demostrado que es capaz de crecer en presencia de PCF y puede degradar este compuesto (Tomasini y col. 1996). En este trabajo se estudiará a *Rhizopus sp* y el efecto que causan ciertas condiciones de cultivo en la degradación del PCF.

## 1.-PENTACLOROFENOL

El PCF se obtiene por cloración de fenoles y por la hidrólisis del hexaclorobenceno. En los procesos clásicos, los clorofenoles son producidos por una cloración alta de bencenos por hidrólisis en soluciones de 10-15% de hidróxido de sodio o carbonato de sodio a temperaturas arriba de 360°C y a presiones de 280-300 bar. El proceso más moderno es por hidrólisis catalítica con catálisis de fosfato de calcio o silicatos a temperaturas arriba de 450°C. Ambos procesos son utilizados en la industria química.

### ESTRUCTURA QUÍMICA.



El PCF grado técnico está contaminado con un gran número de productos policlorados fenólicos y neutros. Los componentes fenólicos incluyen tri y tetraclorofenoles y las predioxinas e isopredioxinas, formadas por la condensación de dos moléculas de PCF que son fuente de formación de tri y tetraclorofenol impuros. Los contaminantes neutrales incluyen: policlorodibenzodioxinas cada una está formada por el anillo cerrado de predioxinas, policlorodibenzofuranos cada una es formada por la reacción del PCF con hexaclorobenceno por perdida

de HCl, policlorodifenil eter cada uno es formado por condensación de radical libre del PCF, ciclohexanonas cloradas y ciclohexadienonas, notable 2,3,4,4,5,6-hexaclorociclohexa-2,5-dien-1-ona (hexaclorofenol) formada por cloración de radical de los clorofenole, y hexaclorobenceno (HCB).

## 1.1 PROPIEDADES FISICAS.

El PCF puro se presenta en forma de cristales blancos , en forma comercial se presenta como hojuelas grises. El PCF anhidro puro funde cerca de 190°C. El compuesto monohidratado funde a 174°C pero productos grado técnico pueden fundir a 187°-199°C o menos debido a la presencia de impurezas; como se puede ver en las sales de PCF de alto punto de fusión.

Cerca de su punto de ebullición la presión de vapor de 360 Torr es alcanzada a 300.6°C pero a temperatura ambiente el PCF se considera volátil, a 100°C, 0.167g de PCF se destila con vapor con 100g de agua. A pH ácido el PCF es soluble en muchos solventes orgánicos pero ligeramente soluble en agua. Sin embargo su solubilidad, volatilidad y partición debe ser considerada en relación a su ionización a un pH=2.7.

**TABLA 1. PROPIEDADES FISICAS**

PROPIEDADES		Solubilidad en agua		PKa (25°C) 4.70	
	T	T	g/l	Coeficiente de partición (kp), 25°C	
Punto de fusión	190°C	0 °C	0.005	Octanol -H <sub>2</sub> O	1760 (log kp 2.15)
Punto de ebullición	300.6° C	20°C	0.014	Hexano-H <sub>2</sub> O	1.03x10 <sup>5</sup> (log kp 5.01)
P. de vapor Torr		30°C	0.20		
T	(mmHg)	50°C	0.035		
0°C	1.7x10 <sup>-5</sup>	70°C	0.085		
20°C	1.7x10 <sup>-4</sup>	Solubilidad en disolventes orgánicos g/l (25°C)			
50°C	3.1x10 <sup>-3</sup>	Metanol		180	
100°C	0.14	Acetona		50	
200°C	75.6	Benceno		15	
300°C	758.4				

## 1.2 PROPIEDADES QUIMICAS

Como cualquier fenol el grupo hidróxilo del PCF toma parte en reacciones nucleofílicas, los electrones de cloro alejados por los anillos del PCF hacen que sea un ácido débil (pka=4.70 en H<sub>2</sub>O), aproximadamente comparable con el ácido propiónico (pka=4.9) y un nucleófilo relativamente débil, cuando se estabilizan sus sales (NaPCF). Es un compuesto estable comercialmente aunque los altos grados

de cloración hacen al anillo aromático suficientemente electropositivo para formar complejos de transferencia de carga estables con donadores de electrones, los anillos de cloro son resistentes a desplazamientos nucleofílicos bajo condiciones normales.

**TABLA 2. COMPOSICION COMERCIAL DEL PCF.**

COMPONENTE	NIVEL ( % o ppm )			
	Técnico PCF %			PCF Puro
PCF	85-90	84.5	88.4	90.4
TCP	4-8	3	4.4	10.4
Triclorofenoles	< 0.1	----	< 0.1	< 0.1
Clorofenoles altos	2-6	----	6.2	----
Fracción neutra	ppm			
TCDD(tetraclorodibenzodioxina)	0	< 0.1	----	< 0.05
PCDD(Policlorodibenzodioxinas)	----	<0.1	----	----
HCDD	9-27	8	4	1.0
HpCDD	----	520	125	6.5
OCDD(octaclorodibenzodiona)	575-2510	1380	2500	15.0
PCDF(policlorodibenzofurano)	----	40	----	----
HCDF(hexaclorodibenzofurano)	Presente	90	30	3.4
HpCDF	presente	400	80	1.8
OCDF(octaclorodibenzofurano)	presente	260	80	< 1
HCB (hexaclorobenceno)	----	----	----	400

## 2.-USOS

El PCF es un químico industrial usado como pesticida, herbicida, desecante para cosecha de semilla de forraje, insecticida para colmenas y semillas para parcela, adelgazador para pulpa y papel, uso en invernaderos, microbiocida para algodón, lonas y sogas, preservador de aceite y pinturas de agua, microbicida para taladro de petróleo y barro, antimoho en lana, controlador de hongos y algas y en el control de mohos en soluciones fotográficas. En los 30's el PCF es introducido como conservador de madera para la construcción; en la agricultura y en aplicaciones como fungicida, bactericida, herbicida, moluscida (Crosby y col.,1979, Kirk y Othmer 1993).

## 3.-TOXICIDAD

El suelo y el agua cercanos a los sitios en donde se usa el PCF como preservador de madera se encuentran altamente contaminados por este compuesto. Además es considerado como uno de los contaminantes de mayor prioridad en algunos países (Arcand y col.,1995).

### 3.1. EN ANIMALES

El pentaclorofenol (PCF) incrementa el pH y decrece la concentración del oxígeno disuelto en el agua, afectando a animales de agua dulce. Generalmente la toxicidad incrementa al aumentar la temperatura. Se ha estimado la sensibilidad de 36 especies a un pH= 6.5 y a una concentración de 4.355ppm, para larvas de carpas comunes de 43.920µg/l . A pH= 6.5 los valores estimados como bajos y

altos son de 1.835 y 79.66µg/l respectivamente para diferentes especies de cladoceros, la toxicidad del PCF grado industrial para peces, es afectada por la presencia de impurezas siendo más tóxico que en muestras purificadas (USEPA., 1986).

En mamíferos expuestos eleva la temperatura de la piel, incrementa la respiración, eleva la presión de la sangre y la tensión cardiovascular (Crosby y col.,1979). En algunos estudios realizados en animales se ha observado que el PCF grado técnico produce efectos como: la supresión de dosis dependiente de la respuesta humoral en ratones, reducción de hipersensibilidad cutánea retrasada y producción de anticuerpos contra albúmina de bovino. En ratas tratadas con el PCF al 97% se encontró un efecto citotóxico en esplenocitos de murinos que generan formas celulares raras y se observó una disminución de peso en el timo del ganado expuesto al PCF (Colosio y col.,1993). En otros estudios aplicados en cultivo embriológico de ratas y en hidras, en particular con Hidra attenuata , se demostró una relación lineal entre toxicidad y el grado de sustitución de cloros: C<sub>5</sub>P > 2, 3, 4, 5-C<sub>4</sub>P > 2,3,5-C<sub>3</sub>P > 3,5-C<sub>2</sub>P > 4-CP > Fenol. Estos mismos resultados sugieren que los fenoles clorados son teratógenos en un grado mínimo (Mayura y col.,1991).

### 3.2. EN HUMANOS

El PCF es clasificado por el USEPA como un probable cancerígeno humano (Karamanev y col., 1997). El PCF es corrosivo para la piel, causa quemaduras y produce irritación en la nariz y garganta (Crosby y col.,op. cit.). También se ha observado que el PCF es un inhibidor de la acetilcolinesterasa en eritrocitos humanos, además de que puede romper a los eritrocitos pues se ha observado que la membrana de éstos tiene múltiples sitios de inicio para el PCF con

afinidades diferentes. El PCF ha mostrado ser además un desacoplador potente de la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Igisu y col.,1993). Con el fin de proteger la salud pública, fueron derivadas dos aproximaciones para niveles de toxicidad del PCF, obteniendo un nivel derivado de 1.01 $\mu$ g/l. Usando datos organolépticos evaluados para controlar sabores y olor indeseable en la calidad del agua ambiental, el nivel estimado es de 30 $\mu$ g/l. Podría ser reconocido que los datos organolépticos tienen limitaciones como una base para establecer criterios de calidad del agua, y no ha demostrado tener efectos potenciales en la salud (USEPA., 1986).

#### **4.-METODOS PARA LA DEGRADACION DEL PCF**

Los métodos propuestos para tratar los clorofenoles y bifenilos policlorados dependen de muchos factores como: costo, cantidad de compuesto que se va a tratar, así como las características de éste. Los principales métodos de tratamiento y destoxificación de estos residuos son: tratamientos físicos, químicos y biológicos (Rich, 1987).

##### **4.1. Métodos Físicos.**

Los procesos físicos se pueden considerar como métodos de separación de compuestos tóxicos de materiales que pueden volver a ser aprovechados. En general, estos procesos separan el residuo por aplicación de fuerzas físicas o cambiando la forma física del mismo. Estos procesos dependen esencialmente de las propiedades físicas del contaminante, como tamaño de la partícula, peso específico, viscosidad, entre otros. Estos pueden ser sedimentación, filtración, centrifugación, flotación, destilación, evaporación, arrastre mediante vapor o aire,

absorción, adsorción, ultrafiltración, ósmosis inversa, cristalización, encapsulamiento y electrodiálisis. Sus ventajas son simplicidad, costo relativamente bajo y amplio intervalo de aplicación. La mayor desventaja que tiene es que se requieren grandes concentraciones de estos compuestos para su procesamiento (Rich, op. cit.). Otros métodos físicos son los térmicos los cuales inducen cambios permanentes en los residuos peligrosos; el volumen final se reduce considerablemente y permite la recuperación de energía, ya que es posible obtener importantes cantidades de vapor a alta presión, a partir del cual se pueden generar diversos servicios (Iñaki, 1988). Entre estos métodos se encuentran los siguientes: incineración de alta temperatura, método de microondas, y vitrificación. Estos métodos no son utilizados a nivel industrial debido a que tienen como desventaja altos costos para su aplicación (Rigola, 1989)

#### **4.2. Métodos Químicos .**

Estos tratamientos se basan en la modificación química de las propiedades de los residuos peligrosos; haciéndolos reaccionar con productos químicos para eliminar los átomos de cloro de la molécula, también para cambiar la estructura molecular de los productos o para destruir selectivamente los productos clorados. Con esto las sustancias se convierten en no tóxicas y su solubilidad en el agua se reduce (Rich, op. cit.).

#### **4.3. Métodos biológicos.**

La biodegradación y la biorremediación de contaminantes en el ambiente se basa en la capacidad de los microorganismos para transformar contaminantes a

productos no tóxicos (Janssen y Schanstra, 1994), o en su capacidad de controlar y destruir los contaminantes metabolizándolos (Macdonald y Rittmann, 1993). Los microorganismos empleados se seleccionan de acuerdo a su capacidad para degradar sustancias tóxicas específicas. Algunos compuestos sintetizados son resistentes a la biodegradación y son contaminantes persistentes en el ambiente. La incapacidad de los microorganismos para degradar estos compuestos puede ser observada como un problema de actividad y especificidad enzimática (Janssen y Schanstra, op. cit.).

Los procesos de destrucción biológica de clorofenoles representan una opción práctica para la biorremediación de suelos. El criterio de efectividad para este tipo de tecnologías, es que sean capaces de disminuir la contaminación a niveles de 1 a 10ppm (INIE, 1994). Entre los microorganismos más utilizados para la degradación del PCF están las bacterias y algunos hongos. Se ha observado en suelos tratados con bacterias que mineralizan arriba del 65% del PCF (Pfender y col., 1997) , aunque en algunos estudios se ha indicado que la mineralización del PCF en el suelo no es completa (Seech y col., op. cit.). Además las bacterias son utilizadas para la degradación de la lignina y la celulosa en fermentación sólida (Pometto y Crawford, op. cit ). Por otro lado, se ha observado que la biodegradación en suelos y la desaparición de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH) en el tratamiento de aguas, se incrementa con la asociación de un microorganismo y la raíz de algunas plantas (Walton y Anderson, 1992). En cuanto a los hongos, se han utilizado como agentes blanqueadores de pulpa y desclorizadores de efluentes (Nagarathnamma y Bajpai, 1999); así como degradadores del PCF en medios acuosos y en suelos. Debido a su tipo de crecimiento por hifas los compuestos tóxicos están más disponibles que para las bacterias (Lamar y Dietrich, 1990).

Otro nuevo concepto de biorremediación es la inmovilización de células, que consiste en atrapar partículas de suelo en bioreactores, que muestran la actividad microbiana en la degradación de contaminantes, así como la mineralización del PCF (Karamanev y col. op. cit.).

## 5.- DEGRADACION POR HONGOS FILAMENTOSOS

La aplicación de los hongos filamentosos para la degradación del PCF ha sido ampliamente estudiada, principalmente empleando a los basidiomicetos, hongos lignolíticos. Los estudios de degradación del PCF por hongos filamentosos diferentes a los basidiomicetos son muy pocos. Cserjesi y Johnson (1971) encontraron que el hongo *Trichoderma virgatum* es capaz de degradar en un 75% al PCF con una concentración inicial de 10ppm del mismo, en un período de incubación de 12 días a 25°C. Además determinaron que solo un 10-20% del PCF degradado fue convertido al intermediario pentacloroanisol (PCA).

También estimaron que la toxicidad de este hongo es de 1000 veces menor que la toxicidad presentada por el PCF en pruebas realizadas con peces. Referente a los hongos de la pudrición blanca, se encuentra gran cantidad de información, en especial para *Phanerochaete chrysosporium* (Lamar y col., 1990; Lamar y Dietrich, 1990; Logan y col., 1994; Mileski y col., 1988; Reddy, 1995).

## 6.- RUTAS METABOLICAS DE LA DEGRADACION

Las rutas metabólicas de la degradación del PCF han sido estudiadas principalmente con *P. chrysosporium*. Se han propuesto varias rutas para esta

degradación. En el primer mecanismo propuesto el PCF puede ser degradado por enzimas extracelulares a algunos intermediarios, con la subsecuente degradación a CO<sub>2</sub> por las enzimas intracelulares. En el segundo mecanismo, las enzimas intracelulares pueden degradar directamente el PCF a CO<sub>2</sub> sin necesidad de la reacción inicial producida por las enzimas extracelulares. el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es necesario para la actividad de las enzimas extracelulares para convertir el PCF a intermediarios metabólicos, el cual es producido por la enzima intracelular glucosa-oxidasa a partir de glucosa y O<sub>2</sub>, y/o por las oxidasas extracelulares a partir de productos metabólicos, en donde se incluye al manganoso peroxidasa (MnP) en estado oxidado. Cabe destacar que estos mecanismos propuestos involucran una reacción en serie realizada por varias enzimas para la degradación del PCF (Lin y col., 1989)

## 7.- BASIDIOMICETOS

Se han estimado alrededor 1,400 especies de hongos, conocidos como de pudrición blanca, (Lamar y Dietrich, 1990). Estos son muy eficientes en la degradación de la lignina a dióxido de carbono y agua, en cultivo puro (Gold y Alic, 1993, Hatakka, 1994). Entre los basidiomicetos se encuentra *P. chrysosporium*, el cual ha sido el más estudiado y utilizado en la biorremediación y en el tratamiento de aguas debido a su rápido crecimiento con respecto a otros basidiomicetos (Logan y col., 1994). Este hongo tiene la habilidad de degradar una gran variedad de contaminantes recalcitrantes; dioxinas, bifenilos, policlorados (Thomas y col., 1992, Reddy 1995); así como de transformar un gran número de xenobióticos (Lamar y Dietrich, 1990), tales como los clorofenoles (Pérez y col., 1997) y el TNT (Bumpus y Tatarko, 1994). También

se ha observado que dos especies de hongos conocidos como de pudrición café, *Gloeophyllum striatum* y *G. trabeum*, degradan 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol, en un 54% y 27% repectivamente (Fahr y col., 1999). Entre otros hongos utilizados en la degradación, podemos mencionar a los zigomicetos, que se ha observado que tienen la capacidad de metabolizar hidrocarburos aromáticos oxidándolos (Sutherland, 1992); así como de blanquear proteasas ácidas que son utilizadas industrialmente para la producción de detergentes (Ikasari y Mitchell, 1996).

Además se han realizado otros trabajos para seleccionar cepas de hongos microscópicos de diferentes grupos taxonómicos que son capaces de degradar compuestos aromáticos policlorados y compuestos xenobióticos (Krivobok y col., 1998, Vroumsia y col., 1996) y fenólicos (Guiraud y col., 1995).

## 8.- ZIGOMICETOS

Estos hongos carecen de elementos reproductores flagelados . Las esporas sin flagelos se llaman aplanosporas y se forman dentro de esporangios. En ciertas formas más evolucionadas los esporangios no forman aplanosporas, sino que se comportan como una espora y reciben el nombre de conidios o conidiosporangios. La reproducción sexual se efectúa por copulación gametangial o gametangia, formándose una cigospora, carácter del que deriva el nombre de la clase. Algunos autores llaman conjugación al proceso de fecundación de los zigomicetos, motivo por el cual les dan a estos la denominación común de hongos conjugados .

Tanto las aplanosporas como los conidiosporangios germinan directamente por medio de tubos que después forman el micelio. Este se encuentra bien desarrollado, con numerosas hifas cenocíticas ramificadas, cuyas paredes están constituidas de quitina; en ocasiones las hifas tienen septos. Son hongos

eucáriticos en los que se distinguen muy bien las hifas vegetativas y reproductoras.

La clase zigomicetos se divide en tres órdenes:

- Orden Mucorales. La reproducción asexual se efectúa esencialmente por aplanosporas contenidas en esporangios; generalmente son saprobios.
- Orden entomophthorales. La reproducción sexual se efectúa principalmente por esporangios que se comportan como esporas; casi siempre viven como parásitos de insectos.
- Orden Zoopagales. Reproducción asexual por aplanosporas (conidios) fusiformes, filamentosas o globosas, que corresponden a conidisporangios o esporangiolos parásitos, depredadores de protozoarios, rizópodos o de nemátodos, principalmente (Herrera y Ulloa, 1990).

### **8.1 Gen. *Rhizopus* Ehrenberg.**

Dos especies de micelio una sumergida en el sustrato y otra aérea, constituidos por filamentos arqueados o estolones. Estos estolones se presentan en los nodos los cuales encuentran en los rizoides los cuales a su vez están implantados en el sustrato. En la punta las esporangiosporas se elevan. Estas pueden ser simples pero usualmente ocurren en grupos de dos, tres ó más. La cuspide del esporangioforo es grande e una apófisis, del tipo que tiene una columnela incrustada encima del punto donde el agregado esférico se inclina en el filamento. De el primer esporangio blanco sigue la maduración a un color azulaceo oscuro. Todos ellos son de la misma clase esféricos o casi esféricos, achatados en la base.

Pared sin cutícula, incrustada uniformemente y enteramente dispareja sin dejar un collar basal. Columnela emisférica formando después dehiscencia, por caída de

de un órgano de la forma de el pileo de un hongo. Esporas redondas u ovaladas, angulares, color pálido, color azulaceo o café, con una pared con cutícula lisa o estriada, raramente espinulosa. Zygosporas desnudas formadas en el sustrato y en el estolón, suspendidos rectamente, muy grandes e hinchados sin apéndices

## 8.2 Claves para las especies de el Género *Rhizopus*

a. Rhizoides bien desarrollados

b. Esporas 9-12 X 7.5-8 $\mu$

1. *R. nigricans*

bb. Esporas 7-9 X 4.5-6 $\mu$

2. *R. Oryzae*

aa. Rhizoides poco desarrollados o escasos

b. Rhizoides raros, pálidos, cortos; sin hincharse

c. Esporangiosporas arriba de 150 $\mu$  de alto

3. *R. Arrhizus*

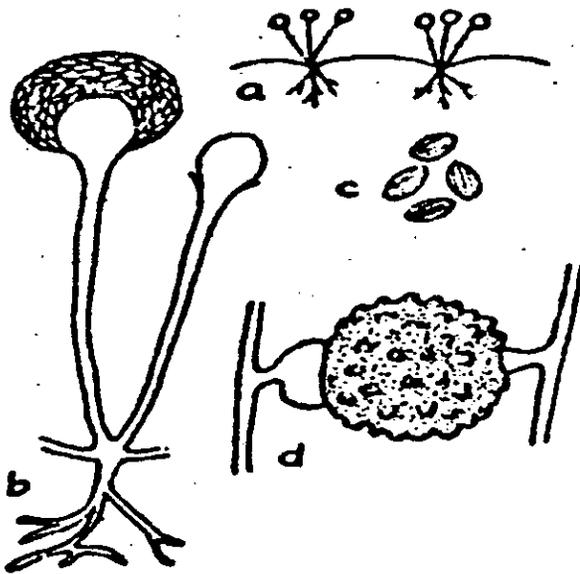
cc. Esporangiosporas menos de 150 $\mu$  de alto

4. *R. Cohnii*

bb. Pocos rhizoides; esporangiosporas y estolones ramificados e hinchados.

5. *R. Nodosus*

(Gilma, 1971).



**FIG. 3. *Rhizopus*. a habit; b sporangiophores; c sporangiospores; d zygospore.**

## 9. ANTACEDENTES

Villarreal (1996) aisló cepas silvestres de tres efluentes diferentes; dos de la industria papelera, de una tannería y de la industria refresquera, inoculando 1ml por separado, en cultivo superficial empleando Agar Dextrosa y Papa (PDA) 50% y el medio sintético Melin-Norkrans (50%) adicionando 5ppm de PCF, ajustando el pH 4.5. Las cajas se incubaron a 30°C durante 4-5 días, aislándose los hongos que crecieron sobre la parte del medio sintético conteniendo PCF.

Las cepas seleccionadas se sembraron de nuevo en medio sintético con 5ppm de PCF, las cepas que crecieron se volvieron a sembrar con 10ppm de PCF,

sembrándose de nuevo las cepas crecidas, pero a una concentración de 12.5 ppm de PCF; de esta forma se seleccionaron de nuevo las cepas capaces de crecer a esa concentración y así poder continuar los ensayos de tolerancia al PCF. De las cuatro cepas obtenidas en el aislamiento se seleccionó la que presentó el más rápido y mejor crecimiento radial, la cepa seleccionada se identificó como un *Rhizopus sp.*

Con la cepa seleccionada Tomasini y col. (1996), realizaron experimentos para determinar la tolerancia del hongo, al PCF con diferentes concentraciones, comparándolo con el *Phanerocheate chrysosporium* en medio sintético con limitación y sin limitación de nitrógeno, obteniendo como resultado que el *Rhizopus sp.* fué más tolerante al PCF ya que resiste hasta 50ppm y el *P. chrysosporium* sólo 25ppm. Además la cepa de *Rhizopus sp.* a 25ppm tuvo mejor crecimiento en el cultivo con limitación de nitrógeno y a mayores concentraciones de 25ppm el crecimiento fue mejor en cultivos no limitados en nitrógeno.

## JUSTIFICACIÓN

En México, las aguas de desecho de las industrias del azúcar, la pulpa, el papel, del acero, el petróleo y refinados representan aproximadamente un 90% del total de las aguas residuales industriales. Estas aguas contienen concentraciones elevadas de clorofenoles y otros compuestos tóxicos recalcitrantes (Poggi y col., 1989). Para la degradación de este tipo de compuestos se ha estudiado más el uso de basidiomicetos. Se ha observado que el uso de otros hongos como los zigomicetos mucorales tiene ventajas sobre los basidiomicetos, ya que estos crecen rápido a temperatura ambiente. Un ejemplo de ellos es el *Rhizopus* el cual se encuentra en la naturaleza, se propaga fácilmente y a bajos costos, de ahí la importancia de conocer las condiciones en donde se logre una mayor degradación del PCF, para determinar si es conveniente utilizar este hongo en la biorremediación y/o biodegradación de compuestos xenobioticos.

## HIPÓTESIS

Se ha observado que en *Phanerochaete chrysosporium* la degradación del PCF es mejor en cultivos limitados en nitrógeno, por lo tanto la concentración del nitrógeno en el medio puede afectar la capacidad de degradación del *Rhizopus* sp. Así como el pH que es otro factor que influye en la degradación del PCF por *Rhizopus* sp , ya que por un lado la solubilidad de este compuesto depende mucho del pH y por otro también la capacidad enzimática. Además se cree que las enzimas que intervienen en la degradación son peroxidasas y/o fenoloxidasas por lo tanto la concentración de oxígeno afecta la degradación, a mayor agitación hay mayor concentración de oxígeno.

## OBJETIVO GENERAL

DETERMINAR EL EFECTO DE ALGUNAS DE LAS CONDICIONES DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA DEGRADACION DEL PENTACLOROFENOL POR Rhizopus sp.

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- OBSERVAR EL EFECTO DE LA RELACIÓN C/N EN LA DEGRADACIÓN DE PENTACLOROFENOL EN CULTIVO SUMERGIDO.
- DETECTAR LA INFLUENCIA DEL pH EN LA DEGRADACION DEL PENTACLOROFENOL EN CULTIVO SUMERGIDO.
- DEMOSTRAR EL EFECTO DE LA AGITACION EN LA DEGRADACION DEL PENTACLOROFENOL EN CULTIVO SUMERGIDO.

## METODOLOGIA

### 1.- RECUPERACION Y PROPAGACION DEL *Rhizopus* sp.

La cepa de *Rhizopus* sp. se recuperó y propagó en Agar Papa Dextrosa (PDA), 39grs/l., colocándose en 35ml del medio en cajas Petri, inoculándose en cilindros de agar en el centro de las cajas e incubándose a 30° C durante 3-4 días

### 2.- CONSERVACION DE LA CEPA.

El micelio contenido en cilindros de PDA con 50ppm de PCP, se colocó en viales con una solución de glicerol al 25% y se guardaron en ultra congelación (-70°C).

Micelio en aceite mineral: El hongo se creció en tubos de ensaye grandes, con micelio del hongo puesto a crecer anteriormente; cuando el micelio cubrió el tubo se le agregó el aceite mineral (petrolato) y se conservó los tubos a 5°C. El aceite deberá ser esterilizado antes de agregarlo al tubo con el hongo crecido, en tres ocasiones , cada tercer día, durante una hora.

### 3.- SUSPENSION DE ESPORAS.

Para la preparación de la suspensión, se colocaron 50 ml de PDA, en matraces de 250 ml y se inocularon con los cilindros de PDA antes conservados y se incubaron a 30°C hasta su esporulación. Se le adicionó una solución de Tween 80 al 1%, en agua destilada estéril y se sometió a agitación lenta (con una barra

magnética) durante 10-15 minutos hasta suspender la mayor parte de esporas; el conteo de las esporas se realizó en una cámara de Neubauer.

#### **4.- MEDIO DE CULTIVO DE MELIN NORKRANS (Ainsworth, 1995).**

El medio contiene por litro: 5 g de glucosa, 2 g de extracto de malta, 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g. de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y 0.15 g de agar. El mismo medio se empleó para cultivo sumergido, con algunas modificaciones, ya que para este caso no se le agregó el agar y se adicionó mayor cantidad de glucosa (10 g/l) y de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (0.5 g/l). El pH se ajustó a 5.5 en ambos casos.

#### **5.- CULTIVO SUMERGIDO.**

Se preparó medio de cultivo, se adicionó 50 ml del medio a matraces de 250 ml, se inoculó con una suspensión de  $1 \times 10^7$  esporas por mililitro y se colocó a incubación a  $30^\circ\text{C}$  con agitación a 125 rpm. A las 24 hrs después de inocular el medio, se le adicionó 12.5 ppm de PCF, simultáneamente se prepararon controles los cuales estaban libres de PCF.

#### **6.- DETERMINACION DEL AMORTIGUADOR A EMPLEAR.**

Se preparó el medio para cultivo sumergido como se indica en la sección anterior, pero empleando los siguientes amortiguadores :

Carbonato de Calcio 2 g/l

Solución amortiguadora de acetatos (pH:5) :

solución de ácido acético al 0.2 M (11.55 ml en 1000ml)

solución de acetato de sodio al 0.2 M (27.2 g de  $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$  en 1000 ml), empleando 8.8 ml de la solución 1 y 41.2 ml de la solución 2 para diluirlos en un total de 100 ml de medio.

Solución de Citratos (pH:5.3-5.8)

solución A : ácido cítrico monohidratado al 0.1M ( 23.07g en 1000ml)

solución B: citrato de sodio al 0.1M (29.41g en 1000ml), empleando 13.7ml de la solución A y 36.3 ml de la solución B para ser diluidos en un total de 100ml de medio.

## **7.- EFECTO DE LA RELACION C/N, EN LA DEGRADACION DE PCF EN CULTIVO SUMERGIDO, CON DOS RELACIONES : 18.9 Y 38.46.**

Se estudió el efecto de dos relaciones C/N, 18.9 y 38.46. Para la obtención de dichas relaciones se utilizó el medio sumergido, manejando glucosa como fuente de carbono, fosfato de amonio como fuentes de nitrógeno y se eliminó el extracto de malta:

**1a. Relación (18.9).** Se le agregó al medio 1 g de extracto de levadura, 0.5 g de fosfato de amonio y 10 g de glucosa por litro, además de los ingredientes antes mencionados.

**2a. Relación (38.46):** 1 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa y se suprime el fosfato de amonio.

El cultivo sumergido se realizó como se indica en la sección 5.

## **8.- EFECTO DE LA AGITACION EN LA DEGRADACION DEL PCF EN CULTIVO SUMERGIDO.**

Se realizaron cultivos sumergidos con una relación C/N de 18.9, el amortiguador de citratos y una temperatura de incubación de 30°C. Se probaron dos agitaciones 125 y 65 rpm y sin agitación.

## **9.- CINETICA DE CRECIMIENTO Y DE DEGRADACION DEL PCF.**

Para la obtención de la cinética de crecimiento, se realizaron cultivos sumergidos con las condiciones anteriormente establecidas (C/N, agitación y pH). Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se les determinó pH, biomasa y la degradación de PCF.

## **10.-TECNICAS ANALITICAS.**

### **10.1- pH**

Se registra directamente en el medio con un potenciómetro marca Jenco Electronics. LTD.

### **10.2.- BIOMASA.**

El medio se filtró al vacío y se puso a secar el micelio a 75°C durante 24h, por diferencia de peso se obtiene el peso seco de la biomasa.

### 10.3 AZUCARES REDUCTORES. (POR EL METODO DEL ACIDO DINITROSALICILICO. D.N.S.)

Los azucares reductores se determinaron de acuerdo a la técnica de DNS (Miller, 1959).

### 10.4.- CONCENTRACION DE PCF.

Las muestras se filtraron al vacío ajustando el pH a 11., la biomasa se resuspendió en un amortiguador de carbonatos (20 ml), se sonicó en un aparato Branson Ultrasonics 1210 durante 15 minutos y se volvió a filtrar al vacío y centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos para sedimentar las partículas que pueda tener la suspensión y evitar que interfieran en la lectura. Posteriormente los dos extractos se filtraron en una membrana de 0.22µm y se inyectaron al HPLC, en una columna empacada con Rusil C-18 en fase reversa (18nm). El PCF se eluyó con dos disolventes para la fase móvil: disolvente A 1% de ácido acético en agua y B 1% de ácido acético en acetonitril (75:25) y un flujo de 8ml/min. El PCF se leyó en una  $\lambda$  de 238 nm, usando un integrador para determinar el pico.

### 10.5 DEGRADACION ESPECIFICA DEL PCF.

Para obtener la degradación específica de PCF por *R. nigricans* degradado se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Deg. esp.} = \frac{\text{PCF degradado (mg)}}{\text{biomasa (g) tiempo (h)}}$$

Donde PCF es el pentaclorofenol degradado el cual se obtiene de:

$$\text{PCF}_{\text{inicial}} - \text{PCF}_{\text{final}}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.- IDENTIFICACION DEL HONGO.

La cepa de *Rhizopus* fué identificada en el herbario de la FES. Zaragoza UNAM: Como *R. nigricans* através de observaciones microscópicas de microcultivos.

Descripción de la especie : *Rhizopus nigricans*. Ehrenberg. Sinonimia *R. estolonifer* (ehrenb. ex Fr) Lind. Micelio blanco, esporangios en conjunto de color azul grisáceo, casi esféricos y con varios grados de maduración ya que sus tamaños varían mucho, estolones muy largos, aéreos, fijas al sustrato por rizoides bien desarrollados y esporangióforos unidos en un grupo de 3-5 esporas de forma muy variada desde esféricas hasta elipsoides o irregulares. A un aumento de 100x se aprecian casi hialinas, con cierta coloración grisácea; la pared esta ornamentada con estrías muy finas, las esporas miden de 9-13  $\mu\text{m}$  de diámetro.

### 2.- DETERMINACION DEL AMORTIGUADOR.

Debido a que Villarreal (1996) observó que al cultivar a *Rhizopus nigricans* en el medio Melin-Norkrans el pH disminuyó drásticamente durante las 24h (hasta un valor aproximado de 2.5-3), se decidió adicionar un amortiguador al medio de cultivo, para poder evitar esta fuerte caída de pH, ya que un valor de pH ácido no sólo afecta el crecimiento del *R. nigricans* sino que además el PCF es insoluble o poco soluble en agua.

Con el fin de seleccionar el amortiguador más adecuado a emplear en el medio de cultivo para el crecimiento del *R. nigricans* se realizó un experimento adicionando diferentes amortiguadores, tales como carbonato de calcio, citratos y

acetatos. Todas las muestras de los cultivos con los diferentes amortiguadores se tomaron por triplicado.

**TABLA 1. Biomasa de *R. nigricans* en cultivo sumergido Melin-Norkrans con diferentes amortiguadores.**

Biomasa (mg/ml)				
Amortiguadores Tiempo (h)	Carb.de Calcio (mg/ml)	Acetatos (mg/ml)	Citratos (mg/ml)	Controles (mg/ml)
36	4.034	2.904	3.825	3.030
96	3.718	2.137	4.544	2.934

En la tabla 1. Se muestra la biomasa producida por *R. nigricans* a las 36 y 96h, en cultivo sumergido en medio Melin Norkrans con los diferentes amortiguadores. Se observa que la máxima producción de biomasa fue muy similar en el cultivo control y el que contenía el amortiguador de acetatos, entre 2.9 y 3.0 mg/ml medio, mientras que en los cultivos con los amortiguadores de carbonato de calcio y citratos la máxima producción de biomasa fue mayor de 4 y 4.5mg/ml medio respectivamente.

En los cultivos control, con amortiguadores de acetatos y de carbonato de calcio la máxima producción de biomasa se obtiene a las 36h y luego disminuye, mientras que en el cultivo con el amortiguador de citratos la biomasa sigue en aumento hasta las 96h. A las 36h las desviaciones estandard de la biomasa. con los diferentes amortiguadores fueron de 0.49 para el carbonato de calcio, 0.54 para los acetatos y 0.17 para los citratos y para las 96h las desviaciones se encontraron en 0.47 para el carbonato de calcio, 0.36 para acetatos y 0.22 en los citratos. Estos resultados de biomasa pueden deberse al pH presente en cada uno de los cultivos, ya que se observa que el amortiguador de carbonatos no tuvo

efecto en el cultivo, pues la evolución del pH (Fig.1) fue muy similar a la del cultivo control (sin amortiguador). En el cultivo con el amortiguador de acetatos el pH se mantuvo en 5.5 durante las primeras 2h de cultivo y a partir de este momento el pH aumentó hasta 7.5 para terminar con un pH de 8.5. Probablemente el crecimiento tan pobre se debió al pH tan elevado en el medio. El aumento del pH puede ser el resultado de la concentración de la solución de acetatos utilizada 0.2M (Dass y Reddy, 1990), ya que en algunos estudios para observar la degradación de la lignina por *Ganoderma australis* se empleó una solución amortiguadora de 0.05M (Ríos y Eyzaguirre,1992). En el cultivo con el amortiguador de citratos el pH se mantiene casi constante entre 4.6 y 5, es decir el crecimiento no se vió afectado por cambios de pH.

El amortiguador de citratos, fue seleccionado para ser empleado en todos los experimentos como amortiguador en el cultivo del *Rhizopus nigricans* ya que amortiguo el pH durante todo el cultivo.

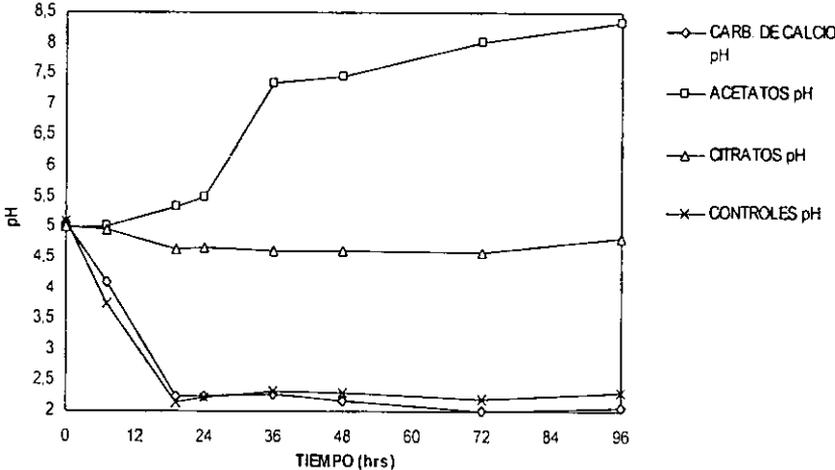


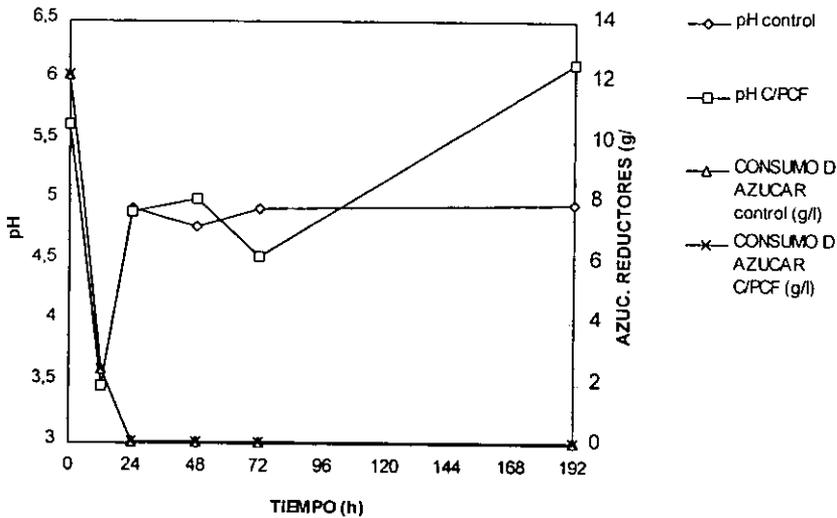
FIG. 1 EVOLUCION DEL pH DURANTE EL CRECIMIENTO DE *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO EN DIFERENTES AMORTIGUADORES INCUBADO A 30°C Y A 125rpm.

### 3. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN LA DEGRADACION DE PCF POR Rhizopus nigricans.

#### 3.1 EFECTO DE LA RELACION DE CARBONO- NITROGENO.

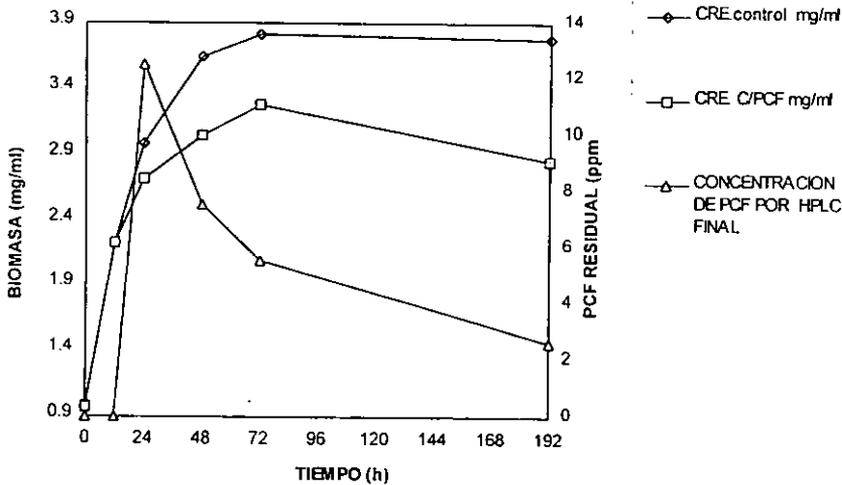
Se sabe que la degradación de la lignina por *Phanerochaete chrysosporium* es mejor en cultivos limitados en nitrógeno, ya que el sistema enzimático es responsable de la degradación se expresa en la fase de metabolismo secundario (Kirk y col.,1978; Reid, 1979; Jeffries y col.,1981,Tien y Myer, 1990). Debido a esto, se consideró importante saber si la limitación por nitrógeno tiene efecto sobre la capacidad de degradación del PCF por *R. nigricans*. Se probaron dos relaciones de C/N, la primera fue de 18.9 en donde se agregó 0.5g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (como fuente de nitrógeno) y la segunda de 38.46 donde se suprime el fosfato de amonio. El PCF fué agregado a las 24h de iniciar el cultivo, para evitar la inhibición de la germinación de las esporas. Mileski et al. (1988), reportaron que el PCF es un fuerte inhibidor de la germinación de las esporas del *P. chrysosporium* y Villarreal (1996) demostró que también la germinación de esporas del *R. nigricans* se inhibe por la presencia del PCF en cultivo sumergido.

## Relación C/N de 18.9



**Fig. 2 CINETICA DE pH Y CONSUMO DE AZUCAR por *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACIÓN DE 18.9 (C/N), A 30°C, 125rpm Y AGREGANDO 12.5 ppm DE PCF A LAS 24h.**

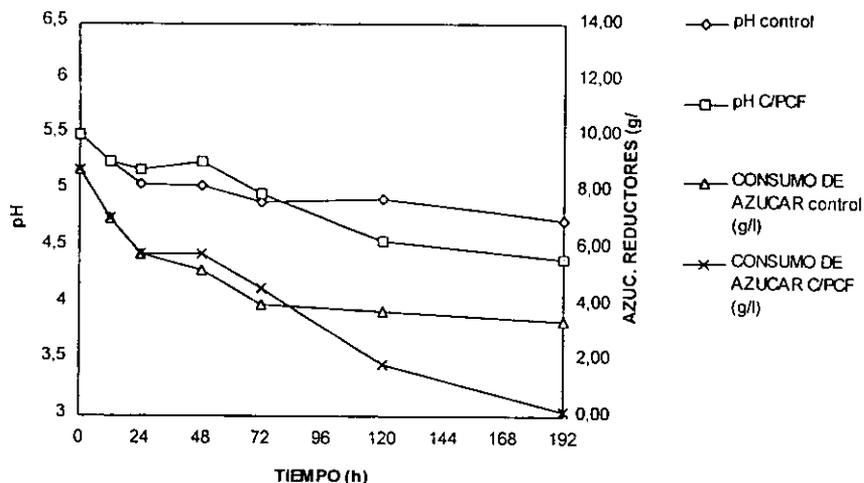
En la Fig. 2 se muestra la evolución del pH y el consumo de azúcares reductores por *R. nigricans* cultivado en medio Melin Norkrans con amortiguador de citratos y una relación C/N de 18.9. Se puede observar que el pH se acidifica a las 12h y se incrementa a 5 a las 24h en los cultivos control y en los cultivos con 12.5ppm de PCF. En el cultivo control el pH varía poco, se mantiene alrededor de 5, mientras que en las muestras con PCF, entre las 24 y 72h, el pH oscila de 5-4.5 alcanzando al término del cultivo un pH de 6 (192h). El consumo de azúcares reductores es muy similar en ambos cultivos, a las 24h se consumió la glucosa presente, en el momento que se adicionó el PCF.



**Fig. 3 CINETICA DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION DEL PCF (AGREGANDO 12.5 ppm A LAS 24h) por *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACION DE DE 18.9 (C/N), A 30 °C Y A 125rpm.**

La Fig. 3 muestra la cinética de crecimiento y degradación del PCF por *R. nigricans* en el cultivo sumergido con 12.5 ppm de PCF inicial. Se observa un perfil de crecimiento muy similar entre el cultivo control y el cultivo con PCF. Durante las primeras 24h se presenta la fase de crecimiento exponencial, a partir de este tiempo el cultivo control presenta una ligera disminución de la velocidad de crecimiento, y a partir de las 72h empieza la fase de mantenimiento. El cultivo con PCF mostró una drástica disminución de la velocidad de crecimiento al momento de adicionar el PCF (24h). En el cultivo control se produjo 1.3 veces más de biomasa que en el cultivo con PCF. En cuanto a la degradación del PCF, se observa una disminución progresiva de éste, hasta el término del cultivo (192h), obteniendo como resultado una degradación final del 80%.

## Relación C/N de 38.46



**Fig. 4** CINETICA DE pH Y CONSUMO DE AZUCAR POR *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUEMERGIDO CON UNA RELACIÓN C/N DE 38.46 (C/N), A 30°C, 125 rpm Y AGREGANDO 12.5 ppm DE PCF A LAS 24h.

En la fig. 4 se observa la evolución del pH y el consumo de glucosa durante el cultivo de *R. nigricans*, en Melin Norkrans con amortiguador de citratos y una relación C/N de 38.46. Durante las primeras 120h el pH se comportó muy similar en los cultivos control y con PCF, a las 120h se observa una ligera disminución de 4.5 en el cultivo con PCF, mientras que en el cultivo control el pH se mantuvo alrededor de 5 hasta las 192h. En cuanto al consumo de azúcares reductores éste es entre las 24 y 72h muy parecido en ambas muestras (control y con PCF), aumentando en el cultivo con PCF entre las 120 y 192h. En el cultivo control ya no se observa consumo de glucosa a partir de este momento; es decir queda una concentración residual de 3.8mg/ml, mientras que en el cultivo con PCF el

consumo de glucosa continúa hasta las 120h; a partir de este tiempo la velocidad de consumo disminuye, obteniendo al final de la fermentación (192h) una concentración residual de 3mg/ml. de glucosa. Estos resultados indican que la velocidad de consumo de glucosa es mayor en el cultivo control, ya que se consumió el 76% en 72h, mientras que en el cultivo con PCF el consumo fue del 60%.

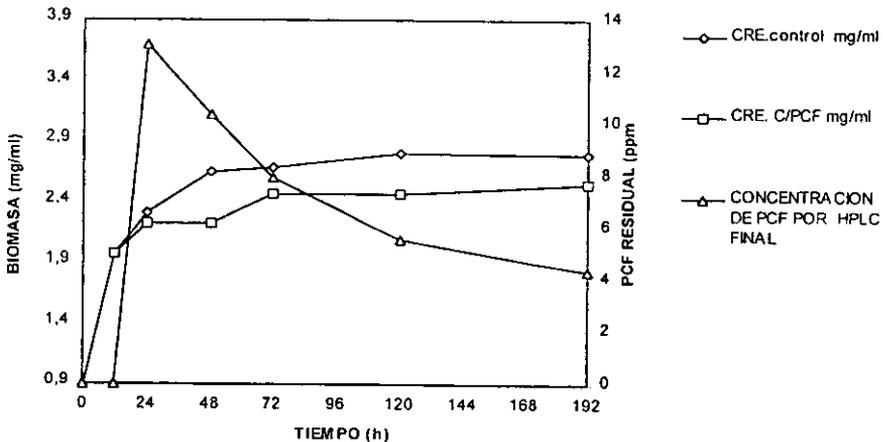


Fig. 5 CINETICA DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION DEL PCF por *Rhizopus nigricans* ADICIONANDO 12.5 ppm DE PCF A LAS 24h. EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACION C/N DE 38.46 . A 30°C Y 125rpm.

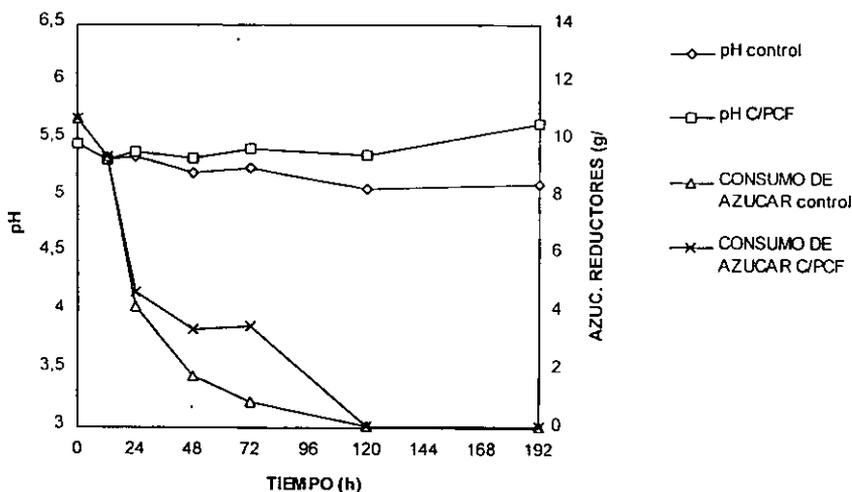
La Fig.5 muestra los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento del *R. nigricans* y la degradación del PCF, por el mismo hongo. Se observa que las curvas de crecimiento son similares entre los controles y las muestras con PCF, obteniendo un poco más de biomasa en el control que en el cultivo con PCF. En cuanto a la degradación final se obtuvo un 66% a las 192h de cultivo. Al comparar la degradación obtenida en ambas relaciones de C/N, 18.9 y 38.46, podemos notar que la degradación así como el crecimiento son menores en el

cultivo deficiente en nitrógeno (relación 38.46). Los resultados muestran que el comportamiento de *R. nigricans* es contrario al de *P. chrysosporium*, ya que este último presenta mayor eficiencia de degradación en medios limitados en nitrógeno (Kirt y col.,1978, Alleman y col.,1992, Aiken y Logan, 1996). El comportamiento del *P. chrysosporium* se debe a que las peroxidasas responsables de la degradación se sintetizan durante el metabolismo secundario (Fenn y Kirk, 1981, Tien y Myer,1990). Para el caso de *R. nigricans* aún no se sabe cuales son las enzimas responsables de la degradación, pero probablemente se sintetizan durante el metabolismo primario.

### **3.2 EFECTO DE LA AGITACION EN LA DEGRADACIÓN.**

#### **Cultivo sin agitación (Con una relación de 18.9 y a 30°C).**

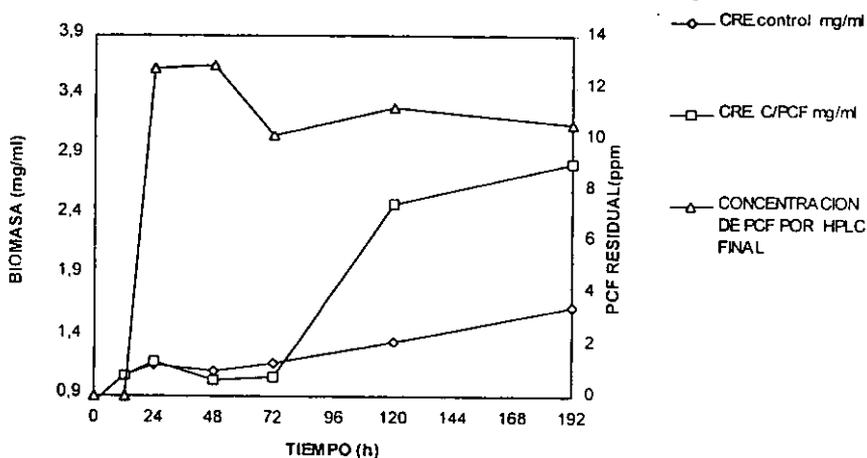
En la **Fig. 6** se presentan los resultados del pH y el consumo de azúcares reductores del *R. nigricans* en cultivo sumergido y sin agitación. Se observa que el perfil del pH es semejante entre el cultivo control y el cultivo con PCF, obteniendo una buena amortiguación en ambos cultivos, ya que los valores se encuentran entre 5 y 5.5. El perfil de azúcares es parecido en ambos cultivos (control y con PCF). Durante las primeras 24h presenta una velocidad de consumo rápido, a partir de las 24h disminuye la velocidad de consumo y en ambos cultivos se agota a las 120 h.



**Fig.6 CINETICA DE pH Y CONSUMO DE AZUCAR por *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACION DE 18.9 (C/N), A 30°C, SIN AGITACION Y AGREGANDO 12.5 ppm DE PCF A LAS 24h.**

La Fig. 7 muestra la cinética de crecimiento de *R.nigricans*, tanto para el cultivo control como para el cultivo con PCF, así como la cinética de degradación del tóxico. Se observa en ambos casos una fase lag muy larga de 72h; la glucosa consumida durante este tiempo probablemente pudo ser empleada para el mantenimiento del micelio y para la esporulación, ya que después de las 72h se inicia la fase de crecimiento acelerado. El cultivo control presenta una velocidad muy lenta y se produce solamente 1.7 mg biomasa/ml de medio, esto se debe a que precisamente a partir de las 72h prácticamente ya no hay glucosa en el medio, hay un residual de 0.5 mg glucosa/ml de medio, además de la falta de aire. La biomasa producida se localiza únicamente en la superficie de los matraces. Mientras que el cultivo con PCF presentó mayor velocidad de crecimiento y hubo

más producción de biomasa, 2.8 mg/ml que en el control. Esto puede deberse que a las 72h cuando termina la fase lag, en el cultivo con PCF había una mayor concentración de glucosa residual (3.5mg/ml) mientras que en el control únicamente había 0.5mg/ml. Otra hipótesis puede ser que el hongo utilizó parte del PCF presente para su crecimiento. Estas condiciones, glucosa residual y el PCF, le permitieron producir más biomasa antes de esporular. A las 120h, cuando termina la fase de crecimiento rápido, se presenta una fuerte esporulación. En cuanto a la degradación se obtuvo solamente el 17% de degradación del PCF, esto se explica por el pobre crecimiento que presentó el hongo. La degradación del PCF se presentó a las 72h de cultivo, cuando empieza la fase de crecimiento acelerado.



**Fig. 7 CINETICA DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION DEL PCF (AGREGANDO 12.5 ppm A LAS 24h) por *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACION DE 18.9 (C/N), SIN AGITACION Y A 30°C,**

## Cultivo sin agitación (hasta las 72hrs) y muestreando cada 12h.

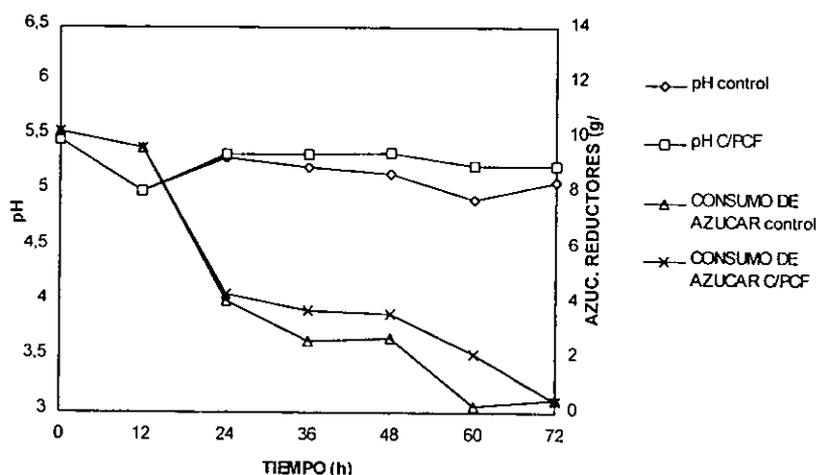
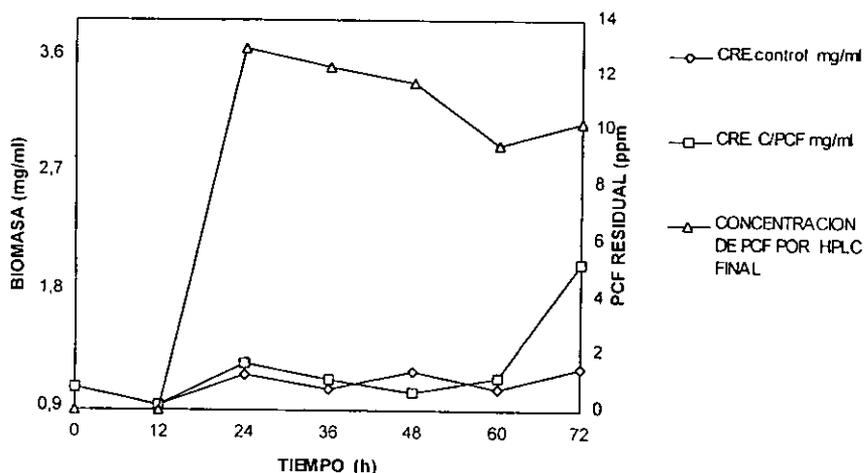


Fig. 8 CINETICA DE pH Y CONSUMO DE AZUCAR POR *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACION DE 18.9 (C/N), SIN AGITACION, A 30°C, AGREGANDO 12.5ppm DE PCF A LAS 24hrs. Y MUESTREANDO CADA 12hrs HASTA LAS 72h.

En la Fig.8 se observa la evolución del pH y el consumo de azúcares reductores durante el crecimiento del *R.nigricans*., en los cultivos sin y con PCF es muy parecido el perfil del pH obteniendo unos valores entre 5 y 5.5, siendo un poco más bajos en las muestras sin PCF, ya que al agregar el PCF en las muestras (a las 24h) el pH desciende acercándose más a un pH de 5. En cuanto al consumo de azucares se observa un comportamiento muy similar al experimento anterior, la velocidad de consumo rápido se presenta durante las 24h después disminuye la velocidad de consumo y al parecer también la glucosa sirvió para mantener al micelio y para la esporulación del hongo. En el cultivo control la glucosa se agota a las 65h mientras que en el cultivo con PCF se agota a las 72h.



**Fig:9 CINETICA DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION DE PCF (AGERGANDO 12.5ppm A LAS 24h) POR *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO SIN AGITACION CON UNA RELACION DE 18.9 (C/N), A 30°C Y MUESTREANDO CADA 12h HASTA LAS 72h.**

La Fig. 9 muestra los resultados de crecimiento y degradación del PCF por el *R. nigricans* en el cultivo sin agitación, con y sin PCF. La fase lag para ambos cultivos es de 72h, como en el experimento anterior. A este tiempo, el cultivo control comienza a esporular, ya no produce biomasa, mientras que en el cultivo con PCF no esporula aún, por lo que empieza una pobre producción de biomasa. En cuanto a la degradación es muy poca, como se observó en el experimento anterior, se obtiene 9.8mg PCF/ml residual, lo que corresponde a una tasa de degradación del 20%, valor semejante al obtenido anteriormente.

## Cultivo a 65rpm con una relación C/N de 18.9

Para saber el efecto de la velocidad de agitación se diseñó un experimento con una velocidad de 65rpm. La evolución del pH es muy similar a la de los otros casos, sin agitación y con 125rpm, manteniéndose alrededor de 5.5 en ambos cultivos, control y con PCF, durante toda la fermentación. En el consumo de azúcares reductores la glucosa se agota completamente a las 24 h para ambos cultivos, control y con PCF (fig. 10).

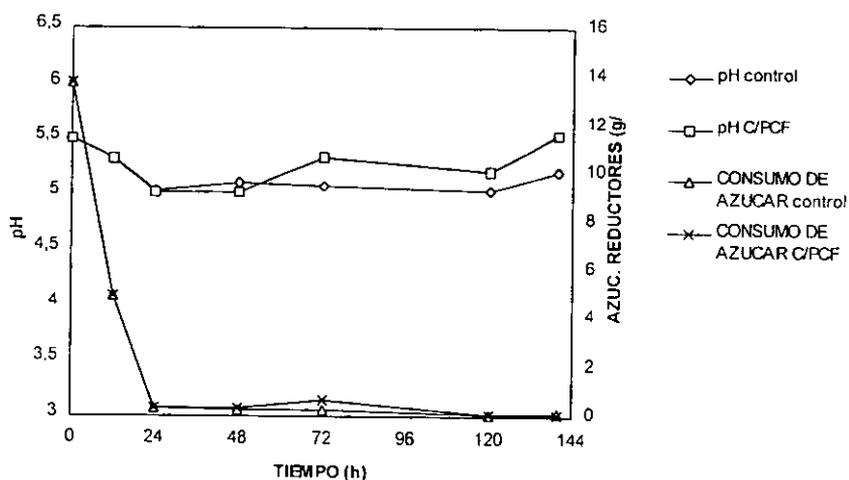


Fig. 10 CINÉTICA DE pH Y CONSUMO DE AZÚCAR por *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACIÓN C/N DE 18.9, A 65rpm, A 30°C Y AGREGANDO 12.5 ppm DE PCF A LAS 24h.

El crecimiento se observa en la Fig.11, con una fase de crecimiento exponencial de 72h en el cultivo control, mientras que en el cultivo con PCF su fase de crecimiento exponencial se detiene al adicionar el PCF, a las 24h. En ambos casos el crecimiento fue muy pobre, la producción máxima de biomasa para el cultivo control fue de 3,4

mg/ml y de 2.8 mg/ml para el cultivo con PCF. Debido al poco crecimiento que se presentó, la degradación del PCF fue únicamente del 28%, valor muy similar al obtenido en el experimento anterior. La degradación fue mayor que la observada en los cultivos realizados sin agitación.

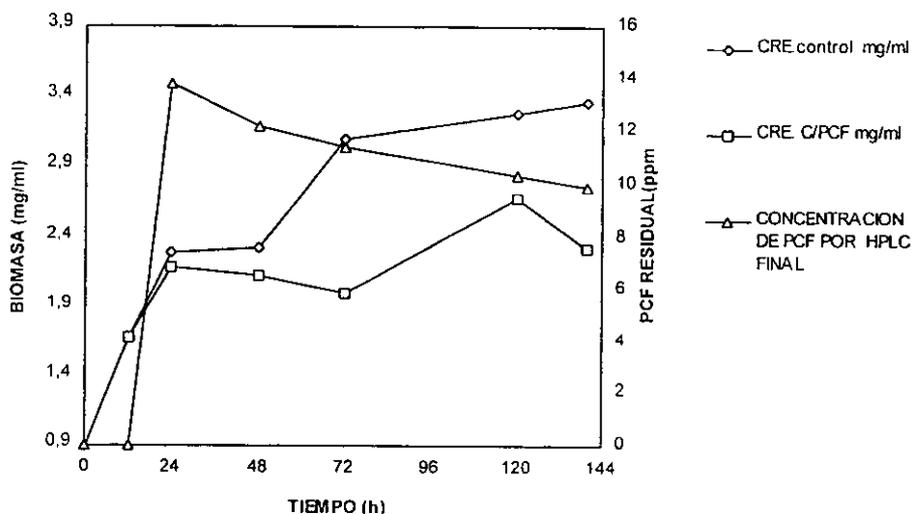


Fig. 11 CINETICA DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION DEL PCF por *Rhizopus nigricans* EN CULTIVO SUMERGIDO CON UNA RELACION DE 18.9 (C/N), A 65rpm, A 30°C Y AGREGANDO 12.5 ppm DE PCF A LAS 24h.

En la tabla 2 se muestra la tasa de degradación específica encontrada en las diferentes condiciones de cultivo ensayadas, sin agitación, con 65 y 125rpm. Los resultados muestran que la eficiencia de degradación de PCF por *R. nigricans* es muy similar cuando se cultiva sin agitación y a 125rpm; y un poco menor en el cultivo con 65rpm. Estos resultados indican que *R. nigricans* es capaz de degradar el PCF en cultivos estáticos, comportamiento semejante al *P. chrysosporium* que es capaz de degradar el PCF empleando células

inmovilizadas. (Laugero y col. 1997). Probablemente en cultivo con células inmovilizadas de *R. nigricans* puede lograrse una degradación de PCF eficiente.

Tabla 2. Biomasa y degradación del PCF por Rhizopus nigricans en cultivo sumergido a las 72 hrs. Con una relación (C/N) de 18.9, a 30°C y con diferentes agitaciones.

Experimento	Biomasa (mg/ml)	Degradación del PCF (%)	Degradación Especifica (mg PCF/mgbio.h)
Sin agitación	1.54	20.88	0.024
65 rpm	2.00	17.25	0.016
125 rpm	3.28	55.44	0.029

## CONCLUSIONES

- Se determinó la especie del hongo como *Rhizopus nigricans* mediante observaciones microscópicas de las estructuras y de acuerdo al crecimiento en el medio de cultivo.
- El amortiguador de citratos fue el mejor en el cultivo, ya que el pH presentó una pequeña variación en el cultivo, estando entre 5 y 5.5.
- En la relación de 18.9 (C/N) se obtuvieron los mejores resultados de crecimiento del *R. nigricans* y una degradación del PCF de un 80% aproximadamente.
- A 125rpm de agitación del cultivo sumergido del *R. nigricans*, se obtuvo el mejor crecimiento de éste y la mayor degradación específica del PCF.

## BIBLIOGRAFIA

- Aiken, S. B. and Logan, B. E. 1996. Degradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in ammonium lignosulphonate media. Biodegradation. 7:p175-182.
- Ainsworth, A.M. 1995. Technical information Sheet No. 11: Isolation techniques for Basidiomycetes. J. Microb. Biotechnol. 11:p 363-366.
- Alleman, B. C., Logan, B. E. and Gilbertson, R. L. 1992. toxicity of Pentachlorophenol to Six Species of White Rot Fungi as a Function of Chemical Dose. Applied and Environmental Microbiology. p 4048-4050.
- Arcand , Y., Hawari, J., and Guiot, S. R. 1995. Solubility of Pentachlorophenol in Aqueous Solutions : The pH Effect. Biotechnology Research Institute. 29: 1, p 131-136.
- Bumpus, A. J. and Tatarko, M. 1994. Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of Initial Degradation Products and the Discovery of a TNT Metabolite That Inhibits Lignin Peroxidases. Current Microbiology. 28:p 185-190.
- Colosio C., Maroni M., Meroni P., Alcini D., Colombi A., Cavallo D. and Foa V. 1993. Toxicological and Immune Findings in Workers Exposed to Pentachlorophenol (PCP). Arch. Environ. Health. 48: 2, p 81-88.

- Crosby D. G., Beynon K. I., Greve P. A., Korte F., Still G. G. and Vonk J.W. 1979. Environmental Chemistry of Pentachlorophenol. Pure Appl. Chem. 53:p 1051-1080.
- Crosby, D:G. 1981. Environmental Chemistry of Pentachlorophenol. Pure Appl. Chem. 35:p 1051-1080.
- Cserjesi, A. J. and Johnson, E.L. 1971. Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. Can J. Microbiol. 18:p 45-49
- Dass, SB and Reddy, CA. 1990. Characterization of extracellular peroxidases produced by acetate-buffered cultures of the lignin- degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol Lett. 1: 57(3) :p 221-224.
- Fahr, K, Wetzstein H-G., Grey R: and Schlosser D. 1999 . Degradation of 2,4 - dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. FEMS Microbiology Letters. 175:p 127-132.
- Fenn, P. and Kirk, T. K. 1981. Relationship of Nitrogen to the Onset and Suppression of lignolytic Activity and Secondary Metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiology. p 59-65.
- Freiter, E. R. 1979. Chlorophenols. Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 5, 3rd. ed. John Wiley and Sons., New York. p 864- 872.
- Gilma C. J. 1971 A Manual of soil fungi. The Iowa State University Press. p 20.

- Gold, M. H. and Alic, M. 1993 Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiology Revs. 57: p 605-622.
- Gribble, G. W. 1994. The Natural Production of Chlorinated Compounds. Environ, Sci. Technol. 28: 7, p 310-319.
- Gu, Y. and Korus, R.A. 1995. Kinetics of Pentachlorophenol degradation by a *Flavobacterium* species. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, p 374-378.
- Guiraud P., Steiman R. , Seigle-Murandi F. and Benoit-Gudoy J:L: 1995. Comparison of the Toxicity of various Lignin-Related Phenolic Compounds toward Selected Fungi Perfecti and Fungi Imperfecti. Ecotoxicology and Enviromental Safety. 32:p 29-33.
- Häggblom, M.M., Nohynek, L. J. and Salkinoja-Salonen, M.S. 1988. Degradation and O-methylation of clorinated phenolic compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 54:p 3043-3052.
- Hatakka, Annele. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected whitw-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews. 13:p 125-135.

- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El Reino de los hongos. Ed. Fondo de Cultura Económica. P
- Igisu, H., Hamasaki, N. and Ikeda, M. 1993 Short Communications , Highly cooperative inhibition of acetylcholinesterase by pentachlorophenol in human erythrocytes. Biochemical Pharmacology. 46:1,p 175-177.
- Ikasari, L. and Mitchell, D. A. 1996. Leaching of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 19:p 171-175.
- (INIE) Instituto Nacional de Investigaciones Eléctricas. 1994. Bifenilos Policlorados en México, Dirección general de Regulación Ambiental, SEMARNAP, México. 1-49.
- Iñaki, S. A. 1988 Técnicas de eliminación de los PCB. Ingeniería Química . 231:p 65-69
- Janssen, D. B. and Schanstra, J. P. 1994. Engineering proteins for Environmental applications. Current Biology. 5:p 253-259.
- Jeffries, T.W., Choi, S. and Kirk, T. K. 1981. Nutritional Regulation of lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. p 290-296.

- Karamanev, G. D., Chvarie, C. and Samson, R. 1997. Soil Immobilization: New Concept for Biotreatment of Soil Contaminants. Biotechnology and Bioengineering 57: 4, p 471-476.
- Kirk, R. E. and Othmer, D. F. 1993 Encyclopedia of chemical Technology. editorial John Wiley and Sons. N. Y. EEUUA.6: p 155-167.
- Kirk, T. K., Connors, W. J., Lorenz, L. F. and Zeikus, J. G. 1978 Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology. 117:p 277-285.
- Krivobok, S., Miriouchkine, E., Seigle-Murandi, F. and Benoit-Guyod. J.L. 1998. Biodegradation of Anthracene by Soil Fungi. 37: p 523-530.
- Lamar, R.T. and Dietrich, D.M. 1990. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. Appl. Environ. Microbiol. 56:p 3093-3100.
- Lamar, R.T., Larsen, M. J. and Kirk, K.T. 1990. Sensitivity to and Degradation of Pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp. Appl. Environ. Micobiol. 56: 11, p 3519-3526.
- Laugero, Ch., Mougin, Ch., Sigoilot, J-C., Moukha, S. and Asther, M. 1997 Comparason of static and agutated immobilizaed cultures of *Phanerochaete*

*chryso sporium* for the degradation of pentachlorophenol and its metabolite pentachloroanisole. Can J. Microbiol. 43:p 378-383.

- Lin, J.E., Wang, H. Y. and Hickey, R. F. 1989. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chryso sporium*. Biotech. Bioeng. 35:p 1125-1134.
- Logan, B.E., Alleman, B. C., Amy, G. L. and Gilbertson, R. L. 1994. Adsorption and removal of Pentachlorophenol by white rot fungi in batch culture. Wat. Res. 28: 7, p 1533-1538.
- 34.-Macdonald, J.A. and Rittmann, B. E. 1993 Performance Standards for In Situ Bioremediation. Environ. Sci. Technol. 27: 19,p 1974-1980.
- Mayura, K., Smith, E.E., Clement, B. A. and Philips, T.D. 1991 Evaluation of the Developmental Toxicity of Chlorinated Phenols Utilizing *Hydra attenuata* and Postimplantation Rat Embryos in Culture. Toxicol. and App. Pharmacol., 108:p 253-266.
- Mileski, G.J. Bumpus, J.A., Jurek, M.A: and Aust, S. D. 1988. Biodegradation of pentachlorophenol by the white-rot fungus *Phanerochaete chryso sporium*. Appl. Environ. Microbiol. 54:p 2885-2889.
- Miller, 1959. Use of linitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analyt. Chem. 31:p 426 - 429.

- Nagarathnamma, R. and Bajpai, P. 1999. Decolorization and Detoxification of Extraction-Stage Effluent from Chlorine Bleaching of Kraft Pulp by *Rhizopus oryzae*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 3, p 1078-1082.
- Perez, R.R., Benito, G.G. and Miranda, P. M. 1997 Chlorophenol Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource Technology. 60:p 207-213.
- Pfender, W.F., Maggard, S. P.; Gander, L: K., and Watrud, L. S. 1997. Comparison of three Bioremediation Agents for Mineralization and Transformation of Pentachlorophenol in Soil. Environmental Contamination and Toxicology. p 230-237.
- Poggi, H. M., Hernández, R., Rinderknecht, N. and Calzada, J.F. 1989. Supplemented kraft condensate treatment in high rate anaerobic processes. 44th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Purdue University West Lafayette, Indiana. p 271-277.
- Pometto III, A. L. and Crawford, D. L. 1986. Effects of pH on Lignin and Cellulose Degradation by *Streptomyces viridosporus*. Applied and Environmental Microbiology. 52: 2, p 246-250.
- Pothuluri, J.V., Freeman., J.P., Evans, F.E. and Cerniglia. C. E. 1990. Fungal transformation of fluoranthene. Appl. Environ. Microbiol. 56 ,10: p 2974-2983.
- Reddy, C.A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Curr. Opinion Biotech. 6:p 320-328.

- Reid, D. I. 1979. The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. National Research Council of Canada/Conseil National de Recherches du Canada. p 205-2058.
- Rich, Q. 1987 Waste treatment technologies, The choice is yours. Pollution and Eng. 14, 117. p 127-135.
- Rigola, L. M. 1989 Tratamiento de aguas industriales Aguas de proceso y Residuales. Marcombo S. A. Barcelona España. p 93-100.
- Rios, S. and Eyzaguirre, J. 1992 Conditions for selective degradation of lignin by the fungus *Ganoderma australis*. Applied and Microbiology Biotechnology . 37:p 667-669.
- Seech, A. G., Trevors, J.T., And Bulman, T. L. 1991 Biodegradation of pentachlorophenol in soil: the response to physical, chemical and biological treatments. Can. J. Microbiol. 37:p 440-444.
- SEMARNAP. 1994. Prevención de la contaminación en fuentes fijas. Departamento del Distrito Federal. México. p 169-230.
- Sutherland, J.B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. J. Ind. Microbiol , 9: pp 53-62.

- Thomas, D.R., Cartswell, K.S. and Georgiou, G. 1992 Mineralization of Biphenyl and PCBs by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology and Bioengineering. 40:p 1395- 1402.
- Tien, M. and Myer, S. B. 1990. Selection and Characterization of Mutants of *Phanerochaete chrysosporium* Exhibiting Lignolytic Activity under Nutrient - Rich Condition. Applied and Environmental Microbiology. 56: 8, p 2540-2544.
- Tomasini C.A., Villarreal A.H y Barrios G. J. 1996. Resistencia de una cepa de *Rhizopus sp.* al crecer en medios contenidos en pentaclorofenol. Avances e Ing. Quim., 6 ,1:p 36-40.
- USEPA, 1986. Quality Criteria for Water. Assoc. Offic. Anal. Chem. , Washington D. C.
- Villarreal, A.H.R. 1996. Aislamiento y selección de hongos filamentosos capaces de degradar clorofenoles. Tesis U. A. de Tamaulipas Reynosa Tamaulipas.p 67-71.
- Vroumsia, T., Steiman, R., Seigle-Murandi, F. Benoit-Guyod, J.L. and Khadrani A. 1996 Biodegradation of three Substituted Phentylurea Herbicides (Chlortoluron, Diuron, and Isoproturon) by Soil Fungi. A Comparative Study. Chemosphere. 33: 10, p 2045-2056.
- Walton, T. B. and Anderson, T. A. (1992) Plant-microbe treatment systems for toxic waste. Current Biology. 3:p 267-270.