



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**BIODEGRADACIÓN DE RESINAS FENÓLICAS  
USANDO HONGOS LIGNINOLÍTICOS**

TESIS QUE PRESENTA

**GRACIELA IBETH PONCE ANDRADE**

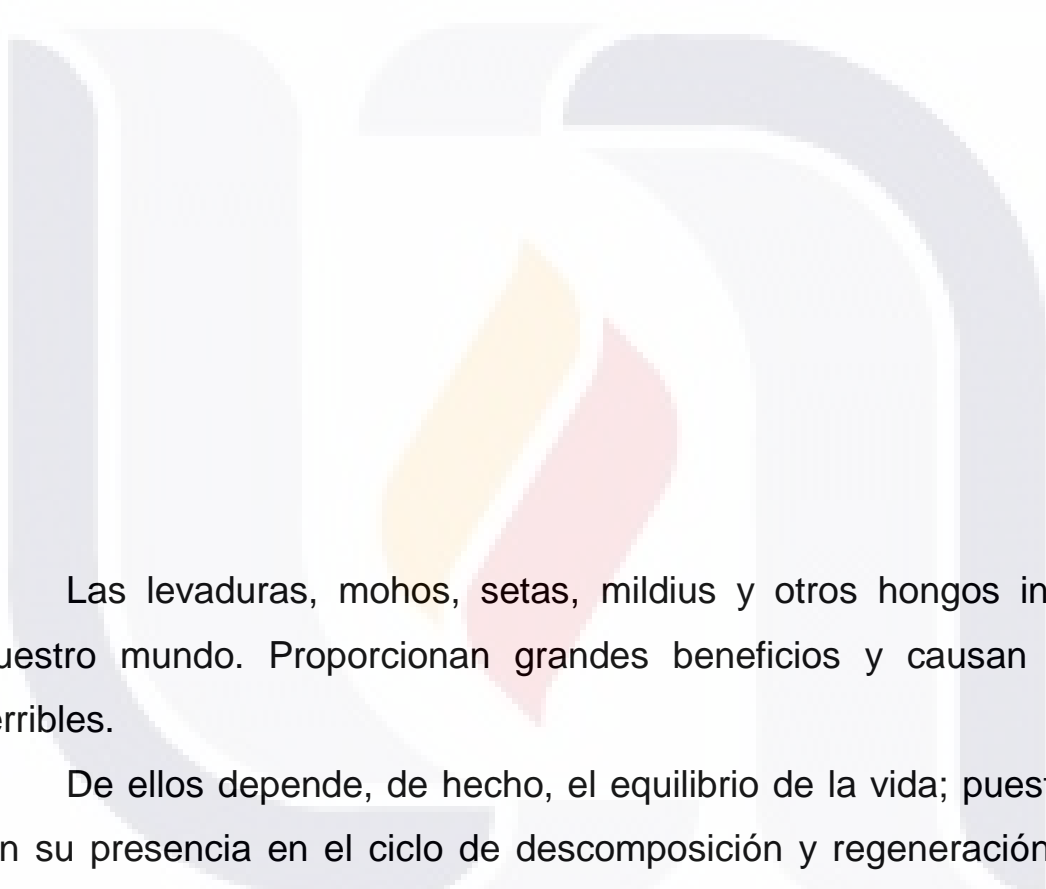
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TUTORES:

DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN  
DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT  
DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VÁZQUEZ

AGUASCALIENTES, AGS., FEBRERO DE 2013



Las levaduras, mohos, setas, mildius y otros hongos invaden nuestro mundo. Proporcionan grandes beneficios y causan males terribles.

De ellos depende, de hecho, el equilibrio de la vida; puesto que sin su presencia en el ciclo de descomposición y regeneración, ni el hombre ni ser vivo alguno podrían sobrevivir.

Lucy Kavalier

---

## COMITÉ TUTORAL

---

- **Dr. Juan Jáuregui Rincón (UAA)**
- **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez (CINVESTAV IPN)**
- **Dr. Rafael Vázquez Duhalt (IBT UNAM)**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

I.B.Q. GRACIELA IBETH PONCE ANDRADE  
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Ponce:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "Biodegradación de resinas fenólicas usando hongos ligninolíticos", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E  
Aguascalientes, Ags., 11 de febrero de 2013.  
"SE LUMEN PROFERRE"  
EL DECAÑO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo  
JJRG,mjda

M. en C. Martha Cristina González Díaz  
Decana del Centro de Ciencias Básicas  
PRESENTE

Estimada M. en C. Martha Cristina González Díaz

Por medio de la presente doy el visto bueno a la tesis de doctorado titulada “Biodegradación de Resinas fenólicas usando hongos ligninolíticos” de la Ingeniero Bioquímico **Graciela Ibeth Ponce Andrade** quien es alumna regular del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Dicho trabajo ya fue revisado por un servidor e Ibeth ya realizó los cambios propuestos.

Sin otro asunto que tratar, no me resta sino enviarle un afectuoso saludo.

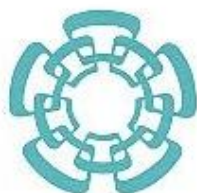
ATENTAMENTE

México, D.F. 29 de junio de 2011



Dr. Juan Jáuregui Rincón

Miembro del comité tutorial



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

México D.F. a 24 de Junio de 2011.


M. en C. Martha Cristina González Díaz  
Decana del Centro de Ciencias Básicas  
PRESENTE

Estimada M. en C. Martha Cristina González Díaz

Por medio de la presente doy el visto bueno a la tesis de doctorado titulada “ **Biodegradación de Resinas fenólicas usando hongos ligninolíticos**” de la Ingeniero Bioquímico **Graciela Ibeth Ponce Andrade**, quien es alumna regular del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Dicho trabajo ya fue revisado por una servidora durante sus evaluaciones y la Ing. Ponce ha atendido los cambios propuestos. Por lo que considero que se ha cumplido satisfactoriamente.

Sin otro asunto que tratar, no me resta sino enviarle un afectuoso saludo.

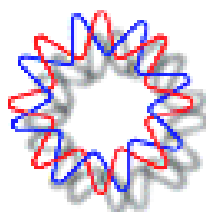
ATENTAMENTE



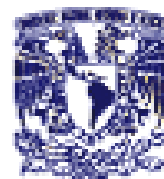
Dra. Refugio Rodríguez Vázquez

Miembro del comité tutorial

Investigadora Titular Depto. de Biotecnología y Bioingeniería



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



*Dr. Rafael Vázquez-Duhalt*  
*Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología*  
*Apartado Postal 510-3*  
*Cuernavaca Mor., 62250 MÉXICO*  
*rvazqu@ibt.unam.mx*

Cuernavaca, 26 de junio de 2011

**M. en C. Martha Cristina González Díaz**  
**Decana del Centro de Ciencias Básicas**  
**PRESENTE**

Estimada M. en C. Martha Cristina González Díaz:

Por medio de la presente doy el visto bueno a la tesis de doctorado titulada "Biodegradación de Resinas fenólicas usando hongos ligninolíticos" de la Ingeniero Bioquímica Graciela Ibeth Ponce Andrade quien es alumna regular de nuestro programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Dicho trabajo ya fue revisado por un servidor e Ibeth ya realizó los cambios propuestos.

Sin otro asunto que tratar, no me resta sino enviarle un afectuoso saludo.

**Atentamente.**

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
**Miembro del Comité Tutoral**

## AGRADECIMIENTOS

---

A Dios, que siempre está conmigo y no me desampara.

Al Dr. Juan Jáuregui Rincón por su confianza, apoyo, orientación y amistad invaluable.

A mis tutores externos Dr. Rafael Vázquez Duhalt y Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por su asesoría y orientación.

Dr. Juan Antonio Lozano Álvarez, Dra. Iliana E. Medina Ramírez, Mtro. José Luis Moreno Hernández Duque cuyo apoyo y colaboración fue muy importante para el desarrollo de este trabajo.

Gloria, Carolina Arce, Martha Aguila, Rosa Román, Araceli, Carmelita, Magda, Norma, Cati, Keila, Ana Laura, Daisy, Adilene, Gustavo, Mario, Paty, Luz Ma, Lucero, por su apoyo y entusiasmo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me otorgó para realizar los estudios de doctorado y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo para el financiamiento de la investigación.



## DEDICATORIAS

---

Dedico este trabajo especialmente:

Al amor de mi vida: Carlos

A mis queridos hijos: Ibeth Stephanie, Alessie Lizeth, José Carlos y Marian Alejandra que son lo más importante en mi vida.

A mis padres: Jaime y Ma. Graciela cuyo ejemplo y fortaleza me han permitido lograr esta meta.

A mis hermanos

A todos ellos, por su apoyo, amor y comprensión.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

---

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Polímeros, plásticos y resinas .....	1
1.1.1 Polímeros .....	1
1.1.1.1 Polímeros sintéticos .....	2
1.1.1.2 Métodos de polimerización.....	3
1.1.2 Plásticos .....	3
1.1.2.1 Clasificación de plásticos sintéticos .....	5
1.1.3 Resinas .....	6
1.1.3.1 Propiedades .....	6
1.1.3.2 Aplicaciones .....	7
1.2 Resinas fenólicas.....	7
1.2.1 Clasificación de las resinas fenólicas .....	9
1.2.1.1 Resoles .....	9
1.2.1.2 Novolacas.....	9
1.2.1.3 Nivel de producción nacional.....	10

1.3 Biodegradación .....	12
1.3.1 Hongos ligninolíticos .....	14
1.4 Antecedentes de la biodegradación de RF .....	15
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 Objetivo general .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 Materiales .....	19
4.1.1 Cepas fungales .....	19
4.1.2 Resina fenólica .....	20
4.2 Métodos .....	20
4.2.1 Síntesis de resina fenólica .....	20
4.2.2 Determinación de fenol .....	21
4.2.3 Obtención de espectro en el infrarrojo de la RF .....	21
4.2.4 Resiembra de cepas fungales .....	21
4.2.5 Ensayos de biodegradación .....	22
4.2.5.1 Prueba preliminar .....	22

4.2.5.2	Ensayo de biodegradación con cultivo en placa.....	22
4.2.5.3	Extracción de posibles productos de degradación .....	23
4.2.5.4	Cinética de degradación utilizando <i>B. adusta</i> 7308.....	23
4.2.6	Métodos de identificación de productos de degradación .....	24
4.2.6.1	Microscopía electrónica de barrido .....	24
4.2.6.2	Separación de posibles productos de degradación utilizando HPLC.....	25
4.2.6.3	Separación e identificación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	25
4.2.6.4	Determinación de actividades enzimáticas:  Lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa .....	26
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
5.1	Síntesis de resina fenólica .....	27
5.2	Resiembra de cepas fungales.....	29
5.3	Ensayo de biodegradación de RF .....	29
5.3.1	Prueba preliminar .....	29
5.3.2	Ensayo de biodegradación con cultivo en placa .....	32
5.4	Observaciones en microscopio electrónico de barrido (SEM) de la RF ensayados en la biodegradación .....	34

5.5 Extracción y separación de posibles productos de degradación	
utilizando HPLC .....	36
5.6 Cinética de degradación utilizando <i>Bjerkandera adusta</i> 7308 .....	40
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
6.1 Síntesis de resina fenólica .....	53
6.2 Ensayo de biodegradación de RF .....	55
6.3 Observaciones en microscopio electrónico de barrido (MEB) de la RF ensayados en la biodegradación .....	57
6.4 Extracción y separación de posibles productos de degradación de RF utilizando HPLC .....	58
6.5 Cinética de degradación utilizando <i>Bjerkandera adusta</i> .....	59
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>8. GLOSARIO .....</b>	<b>68</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b>	
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES .....	A
CARTA DE ACEPTACIÓN PARA PUBLICACIÓN DE ARTÍCULO.....	B
ARTÍCULO PUBLICADO .....	C

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1	Clasificación de plásticos en función de su comportamiento ante el calor.	2
Figura 2	Estructura de resina fenólica	5
Figura 3	Producción de plásticos sintéticos en México (INEGI, 2009)	10
Figura 4	Gráfica de producción de resinas fenólicas en México	11
Figura 5	Gráfica de curva patrón de fenol	28
Figura 6	Espectro de IR de la RF sintetizada en el laboratorio	28
Figura 7	RF en medio de cultivo (control)	31
Figura 8	Cultivo de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 4521 con RF (anverso)	31
Figura 9	Cultivo de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 4521 con RF (reverso)	31
Figura 10	Cultivo de <i>Coriolopsis gallica</i> 8260 con RF(anverso)	31
Figura 11	Cultivo de <i>Coriolopsis gallica</i> 8260 con RF(reverso)	31
Figura 12	RF en contacto con <i>P. chrysosporium</i> 4521 10X	32
Figura 13	RF en contacto con <i>P. chrysosporium</i> 4521 10X	32

Figura 14	Trozo RF control	34
Figura 15	Fragmento de RF en contacto con <i>P. ostreatus</i> 7992	34
Figura 16	Microfotografías en SEM de RF tratada con <i>Bjerkandera adusta</i> 7308	34
Figura 17	Microfotografías en SEM de RF tratada con <i>P. ostreatus</i> 7992	35
Figura 18	Microfotografías en SEM de RF tratada con <i>P. chrysosporium</i> 4521	35
Figura 19	Microfotografías en SEM de RF tratada con <i>T. versicolor</i> 8260	36
Figura 20	Microfotografías en SEM de RF tratada con <i>S. pulverulentum</i> 340	36
Figura 21	Lavado de RF en contacto con <i>P. chrysosporium</i> 4521	38
Figura 22	Lavado de RF en contacto con <i>P. ostreatus</i> 7992	38
Figura 23	Desintegración de RF en contacto con <i>P. ostreatus</i> 7992	38
Figura 24	Desintegración de RF en contacto con <i>P. chrysosporium</i> 4521	38
Figura 25	Cromatogramas de extractos de medio de cultivo <i>P. chrysosporium</i> 4521 con y sin la RF	39
Figura 26	Cromatogramas de extractos de medio de cultivo <i>P. ostreatus</i> 7992 con y sin la RF	39

Figura 27	Cromatogramas de extractos de medio de cultivo <i>B. adusta</i> 7308 con y sin la RF	40
Figura 28	Controles utilizados durante la cinética después de 20 días de incubación	41
Figura 29	Cultivo de <i>B. adusta</i> 7308 y RF después de 10 días de incubación	42
Figura 30	Cultivo de <i>B. adusta</i> 7308 y RF después de 20 días de incubación	42
Figura 31	Cultivo de <i>B. adusta</i> 7308 y RF después de 30 días de incubación	42
Figura 32	Cultivo de <i>B. adusta</i> 7308 y RF después de 40 días de incubación	42
Figura 33	Fotografía de la RF control después de 40 días de incubación	43
Figura 34	Microfotografía 10X después de 40 días de incubación con <i>B. adusta</i> 7308	43
Figura 35	Cromatograma del extracto del medio de cultivo (rojo) y el cromatograma del extracto del medio de cultivo en contacto con la RF	44
Figura 36	Cromatogramas de extractos de RF en contacto con <i>B. adusta</i> 7308 después de 10 días (azul), 20 días (rojo), 30 días (verde) y 40 días (morado) de incubación.	45



Figura 37	Cromatogramas de extractos después de 10, 20, 30 y 40 días de incubación con <i>B. adusta</i> 7308	46
Figura 38	Cromatograma de extracto de <i>B. adusta</i> 7308 sin la RF (rojo) y extracto de la RF en contacto con <i>B. adusta</i> 7308 (azul) después de 20 días de incubación	46
Figura 39	Cromatograma de extracto del medio de cultivo con RF (verde), micelio de <i>B. adusta</i> 7308 sin RF (rojo) y RF en contacto con <i>B. adusta</i> 7308 (azul) después de 40 días de incubación	47
Figura 40	Cromatograma del extracto del medio de cultivo (control)	48
Figura 41	Cromatograma del extracto del medio de cultivo y RF (control)	48
Figura 42	Cromatograma del extracto de <i>B. adusta</i> 7308 creciendo en el medio después de 20 días de incubación	48
Figura 43	Cromatograma del extracto de <i>B. adusta</i> 7308 creciendo en el medio con RF después de 20 días de incubación	49
Figura 44	Cromatograma del extracto de <i>B. adusta</i> 7308 creciendo en el medio con RF después de 40 días de incubación	49
Figura 45	Identificación de los principales compuestos detectados utilizando la biblioteca NIST	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Colección de cepas de hongos ligninolíticos	19
Tabla 2	Condiciones de operación del GC-MS	25
Tabla 3	Datos para curva de calibración para fenol	28
Tabla 4	Observaciones de ensayo de prueba para la degradación de RF por medio de HL	30
Tabla 5	Cepas seleccionadas para observación en MEB	33
Tabla 6	Pérdida de peso después de 30 y 200 días de incubación	33

## SIGLAS UTILIZADAS

<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>GC-MS</b>	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas
<b>GMV</b>	Medio de cultivo con glucosa, malta y extracto de levadura
<b>HL</b>	Hongos ligninolíticos
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>INEGI</b>	Instituto nacional de estadística y geografía
<b>Lac</b>	Lacasa
<b>LiP</b>	Lignina peroxidasa
<b>MEB</b>	Microscopio electrónico de barrido
<b>MnP</b>	Peroxidasa dependiente de manganeso
<b>MO</b>	Microscopio óptico
<b>RF</b>	Resinas fenólicas
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SENER</b>	Secretaría de energía

## RESUMEN

---

Las resinas fenólicas (RF) son plásticos termoestables que se obtienen mediante la condensación de fenol y formaldehído en condiciones alcalinas formando polímeros reticulados mediante el calentamiento. El producto es rígido, frágil, con propiedades dieléctricas y soporta altas temperaturas, pero no puede refundirse ya que se degrada o se quema. Cuando termina su vida útil se convierte en desecho que se acumula porque no se puede reciclar y contamina el medio ambiente. Debido a la importancia comercial y al problema ambiental que generan dichos materiales, es imperativo encontrar sistemas biológicos capaces de biodegradar estos compuestos contaminantes para restablecer el equilibrio del medio ambiente de manera natural.

Los hongos ligninolíticos (HL) también llamados “hongos de la podredumbre blanca” tienen la capacidad de degradar lignina enzimáticamente. La inespecificidad química y la alta actividad oxidante de sus enzimas les otorgan la capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina. Considerando que la estructura de la lignina y las RF tienen estructuras similares, el objetivo de este trabajo es estudiar la biodegradación de las resinas fenólicas usando cepas de hongos ligninolíticos para disminuir su persistencia en el ambiente.

Se sintetizó la RF en el laboratorio y se ensayaron 24 cepas de hongos ligninolíticos en una prueba previa y se seleccionaron las que presentaron mayor potencial para actuar sobre la RF considerando la colonización de la RF y cambios en el color del medio de cultivo circundante. Para demostrar la capacidad de biodegradación de las 8 cepas seleccionadas se colocaron piezas de la RF estéril sintetizada en el laboratorio en cada caja Petri con medio agar malta al 3% y se inoculó cada una de las cepas. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 200 días, observando los cambios en la coloración del medio, el cual se comparó con

una caja control, que contenía la RF en el medio sin hongo y además el crecimiento del micelio sobre el fragmento de la RF. Posteriormente se realizó la extracción de la RF y se determinó el porcentaje de pérdida de peso, observación de la RF en microscopio óptico (MO) y en el microscopio electrónico de barrido (MEB). Posterior a la prueba de degradación se extrajeron productos solubles y se analizaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) y en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), para separar e identificar los productos de degradación.

También se realizó una cinética de degradación con *B. adusta* 7308 durante 40 días muestreando cada 10 días para evaluar cambios físicos usando el microscopio óptico, determinar actividad enzimática y separar e identificar productos de degradación solubles por medio de HPLC Y GC-MS.

El ensayo para evaluar la capacidad de biodegradación de las RF mostró resultados positivos. Las cepas de *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992, *Phanerochaete chrysosporium* 4521, *Trametes versicolor*, *Coriolopsis gallica* 8260, *Sporothricum pulverulentum* 340, *Trametes hispida* y *Trametes trogii* crecieron sobre la resina y además generaron un halo color café en el medio alrededor de la RF, excepto en el control. Las observaciones en el microscopio óptico demostraron que el micelio penetra en la RF, las observaciones realizadas en el SEM proporcionaron evidencia visual de la degradación debido al cambio de la apariencia de la superficie, la cual no se presenta en el control, además de la pérdida de peso, así como la detección de posibles productos de biodegradación en los extractos y la medición de actividad enzimática confirmando con ello la biodegradación ocurrida lentamente.

## ABSTRACT

---

Phenolic resins (PR) are thermoset plastics which are obtained by condensation of phenol and formaldehyde under alkaline conditions to form crosslinked polymers by heating. The product is stiff, brittle, with dielectric properties and withstands high temperatures but cannot be melted. When its useful life ends, it becomes a waste that accumulates, because it cannot be recycled and pollutes the environment. Due to the commercial importance and environmental problem generated, it is imperative to find biological systems able to biodegrade these pollutants in order to restore environmental balance naturally.

Ligninolytic fungi (LF) also called "white rot fungi" have the ability to degrade lignin. Several enzymes are involved in this process and they are nonspecific with the capacity to produce free radicals. Lignin peroxidase, manganese peroxidase, versatile peroxidase and laccases are extracellular enzymes and they are involved in the lignin degradation with the contribution of the intracellular enzymatic system, cytochrome P450. In addition, these enzymes are able to transform a diversity of substrates, including pollutants and toxic compounds.

The chemical non specificity and the strong oxidizing activity of the enzymes will provide the ability to degrade various organic compounds with similar structure to the monomer units constituting the lignin. Considering that the structure of lignin and PR are similar, the objective of this work, it is to study biodegradation of PR using LF strains to decrease their persistence in the environment.

PR was synthesized in the laboratory and 24 strains of LF were tested in a prior test; the ones that showed the greatest potential to act on PR were selected, considering the colonization of PF and the color changes in the surrounding medium. To demonstrate the biodegradability of the 8 selected strains it was placed a piece of sterile PR synthesized in the laboratory in each Petri dish with culture medium of 3% malt agar and each of the strains were inoculated. Cultures

were incubated at 28 ° C for 200 days observing the color changes of the medium compared to a control box containing the PR and the medium without addition fungus mycelial growth on the fragment of the PR. Subsequently the extraction of the PR was performed and the weight loss percentage determined and also the observation of the PR piece under an optical and scanning electron microscopes (SEM). We performed the soluble extract after degradation and injected into the high performance liquid chromatograph (HPLC) and in the gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) to separate and identify degradation products.

It was also performed a degradation kinetics with *B. adusta* 7308 for 40 days making extractions every 10 days to evaluate physical changes using the optical microscope, determinate enzymatic activity and also to separate and identify soluble degradation products by HPLC and GC-MS.

The essay to evaluate the biodegradability of the PR gave positive results. *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992, *Phanerochaete chrysosporium* 4521, *Trametes versicolor*, *Coriolopsis gallica* 8260, *Sporothricum pulverulentum* 340, *Trametes trogii*, *Trametes hispida* grew on the resin and also generated a brown halo color around the piece of the PR which did not came up in the control. The observations at the optical microscope showed that the mycelium penetrates the PR, the observations made with the SEM provided the visual evidence of the degradation due to the change of the appearance of the surface which did not came up in the control, besides the weight loss, as well as detection of the possible biodegradation products in the extracts and enzymatic activity detected, it confirms biodegradation although it occurs very slowly.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. Polímeros, plásticos y resinas

### 1.1.1. Polímeros

Un polímero (del griego *poly*, muchos; *meros*, parte o segmento) es un compuesto formado por un gran número de moléculas. Los polímeros se producen por la unión de cientos de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman enormes cadenas de las formas más diversas (Vigilante, 2005). La mayoría de los polímeros se basan en el carbono y, por consiguiente, son considerados sustancias químicas orgánicas. Sin embargo, el grupo también incluye un número de polímeros inorgánicos (Groover, 1997).

Un polímero no necesariamente consta de moléculas individuales de la misma estructura o composición química y peso molecular. En base a su origen, los polímeros pueden clasificarse como naturales y sintéticos. Los polímeros naturales como las proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, entre otros, son componentes de sistemas biológicos y forman parte de los procesos vitales. También son utilizados para otras aplicaciones como es el caso del algodón, formado por fibras de celulosa que se emplea para hacer telas y papel. La seda, lana, colágeno y la lignina son otros ejemplos. Los polímeros sintéticos están hechos mediante procesos químicos y constituyen la mayor parte de los polímeros que usamos en nuestra vida diaria.

En base a su estructura, las moléculas de las que están integrados los polímeros pueden ser lineales, ramificadas o entrecruzadas, dependiendo del tipo. La configuración de las moléculas depende de la posición y el número de puntos de unión entre las moléculas de la sustancia o sustancias que polimerizan.

Los polímeros lineales son uniones continuas de monómeros; los polímeros ramificados se generan cuando átomos de hidrógeno son reemplazados por átomos de carbono en puntos aleatorios de la cadena y en dichos lugares se inicia el crecimiento de las ramificaciones; y por último los polímeros entrecruzados, que se originan debido a que una cierta proporción de los monómeros que se utilizan para formar el polímero, son capaces de enlazarse a monómeros adyacentes en dos o más lados, permitiendo así la adición de otras moléculas ramificadas formando macromoléculas gigantes con estructuras en red (Groover, 1997).

#### **1.1.1.1. Polímeros sintéticos**

Los polímeros sintéticos son sustancias orgánicas de alto peso molecular que se sintetizan generalmente a partir de compuestos de bajo peso molecular. También pueden obtenerse por modificación química de materiales naturales de alto peso molecular especialmente la celulosa (Cristán, 2003). El consumo de polímeros sintéticos ha aumentado en los últimos años; estos petroquímicos han sustituido parcial y a veces totalmente a muchos materiales naturales como la madera, el algodón, el papel, la lana, la piel, el acero y el cemento. Los factores que han favorecido el mercado de los plásticos son los precios competitivos y a veces inferiores a los de los productos naturales, y el hecho de que el petróleo ofrece una mayor disponibilidad de materiales sintéticos que otras fuentes naturales (Vigilante, 2005).

Los polímeros sintéticos tienen una vida mucho más larga que otros materiales debido a que no son fáciles de biodegradar en el medio ambiente. Una razón importante para la persistencia de estos polímeros bajo condiciones naturales es su hidrofobicidad. Cualquier intento de reducir el carácter hidrofóbico aumentaría la capacidad de los microorganismos para degradar los plásticos (Sodhi, 2000).



### **1.1.1.2. Métodos de polimerización**

Dependiendo de la forma en que se sintetizan, los polímeros están clasificados en dos categorías: Polímeros de adición o polimerización en cadena y polímeros de condensación.

#### **1.1.1.2.1 Polímeros de adición**

Los polímeros de adición están formados por la unión de un monómero a otro por el mecanismo de radicales libres. Este mecanismo se divide en tres etapas; iniciación, donde un catalizador genera un radical libre que se agrega al monómero para liberar otro radical libre; propagación, en la cual el radical libre reacciona con otro monómero para formar cadenas largas; y terminación que consiste en la reacción entre dos cadenas largas en sus sitios activos y los productos son polímeros lineales, ramificados o una mezcla de ambos.

#### **1.1.1.2.2. Polímeros por condensación**

Los polímeros de condensación se forman cuando los monómeros que poseen dos o más grupos funcionales se unen para formar una nueva molécula del compuesto deseado y un subproducto de la reacción que generalmente es agua (Sodhi, 2000). Este tipo de polimerización produce polímeros entrecruzados. El encadenamiento transversal es la causa de que el polímero fije su estructura química o fragüe. Como la reacción es irreversible, el efecto es un cambio permanente en la estructura del polímero; si se somete a calentamiento puede degradarse o quemarse, pero no fundirse (Groover, 1997).

### **1.1.2. Plásticos**

Un plástico es una sustancia capaz de ser moldeada en formas variadas. Todos los plásticos son polímeros, aunque no todos los polímeros son plásticos. El término plástico es usado en un sentido muy amplio para incluir muchos materiales poliméricos tales como el caucho, textiles, resinas, etc.

En el último siglo, la industria plástica ha crecido más rápidamente que cualquier otra rama de la industria química. De hecho, los polímeros sintéticos han llegado a ser tan indispensables que su aumento *per capita* es directamente asociado con el aumento de los estándares de vida. (Sodhi, 2000).

La mayoría de los compuestos denominados “plásticos” son polímeros sintetizados a partir de compuestos orgánicos de bajo peso molecular (Montalvo, 2007) y se caracterizan por ser impermeables, una alta relación resistencia/densidad, que son propiedades excelentes para el aislamiento térmico y eléctrico y de buena resistencia a los ácidos, álcalis y disolventes (Cristán, 2003).

En la vida moderna, el plástico ha constituido un fenómeno de indudable trascendencia. Hoy en día el hombre vive rodeado de objetos plásticos que en siglos anteriores no eran necesarios para la vida cotidiana. Los plásticos se han fabricado para satisfacer las demandas de una gran variedad de usos, dando lugar a una vasta industria donde la civilización debería llamarse la “civilización del plástico”, debido al papel determinante que ha desempeñado este material en su desarrollo, en el mejoramiento de las condiciones de la vida del hombre y el acelerado crecimiento de la ciencia y la tecnología.

Estos materiales han venido a sustituir parcial o totalmente a productos como el vidrio, la madera, la cerámica, el papel, los metales, el algodón, la lana, la piel y demás fibras naturales, incluso, los mismos tejidos orgánicos y hasta el acero y el cemento (Biblioteca Salvat, 1975). A todos ellos aventaja por ser más resistente, elástico o rígido según las necesidades, liviano, impermeable, no corrosivo y económico. Sin embargo, existe un debate muy intenso en relación a sus efectos medioambientales; efectos ligados fuertemente con la materia prima de producción -el petróleo-, su alta persistencia en el ambiente y el consumo extendido a nivel mundial.

### 1.1.2.1. Clasificación de plásticos sintéticos

Los plásticos sintéticos se pueden dividir en dos grandes grupos en función de su comportamiento ante el calor: en termoplásticos y duroplásticos (figura 1).

#### 1.1.2.1.1 Termoplásticos

Los termoplásticos se caracterizan por estar compuestos de moléculas lineales con pocos o ningún enlace cruzado. Tienen la propiedad de que se reblandecen al calentarse y empiezan a fluir, pero al enfriarse, se vuelven sólidos nuevamente. Este proceso se puede repetir numerosas veces. Algunos ejemplos de termoplásticos son el polietileno, nylon, cloruro de polivinilo (PVC) y estireno.

#### 1.1.2.1.2 Duroplásticos

Los duroplásticos, también llamados plásticos termoestables o termofijos, son inicialmente moléculas lineales pero que por calentamiento, forman irreversiblemente una red de enlaces entrecruzados generando una resina con estructura tridimensional que no se funde, dando un producto final generalmente más duro, fuerte y resistente al calor comparado con un termoplástico (Cristán, 2003). Dentro de este grupo con mayor volumen de uso se encuentran las resinas fenólicas, cuyo volumen anual es cerca del 14% del total de plásticos en el mercado (Groover, 1997).

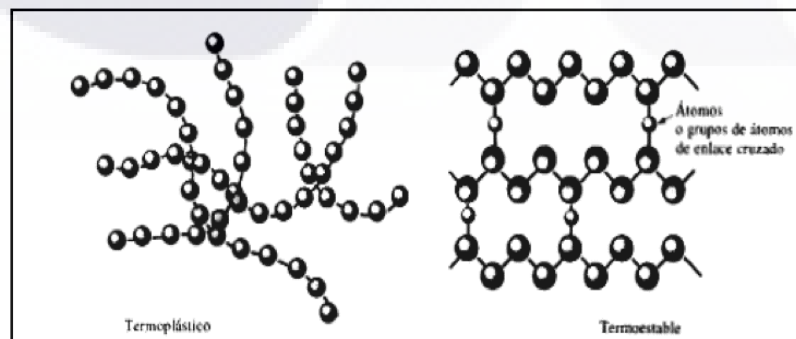


Figura 1. Clasificación de plásticos en función de su comportamiento ante el calor.

### **1.1.3. Resinas**

Se les denomina resinas, a las sustancias naturales modificadas químicamente o sintéticas que sufren un proceso de polimerización mediante una reacción química provocada por un agente externo, dando lugar a productos sólidos, siendo inicialmente sustancias líquidas, y una vez producido el cambio, no es posible volver a su estado anterior.

Las resinas naturales son secreciones orgánicas que producen muchas plantas, particularmente los árboles del tipo conífera. Son muy valoradas por sus propiedades químicas y sus usos asociados, como por ejemplo la producción de barnices, adhesivos y aditivos alimenticios. También es un constituyente habitual de perfumes o incienso.

Las resinas sintéticas pueden definirse como sustancias sólidas o semisólidas, obtenidas por reacción química de materias primas resinosas y no resinosas y que poseen aspectos y propiedades físicas análogas a las resinas naturales, aunque tengan diferente composición química y también diferente comportamiento respecto a los distintos reactivos.

Bajo la acción combinada del calor y la presión estas resinas polimerizan alcanzando un estado irreversible en el que el material se endurece, resultando insoluble e infusible (Montalvo, 2007).

#### **1.1.3.1. Propiedades**

Las resinas presentan estabilidad al calor y resistencia al impacto y a la corrosión por químicos así como a la penetración de humedad.

### 1.1.3.2. Aplicaciones

- Impregnación de resinas para protección contra los efectos del medio ambiente.
- Componentes eléctricos
- Laminado
- Adhesivos para cemento
- Adhesivos para aglomerados
- Moldes

## 1.2 Resinas fenólicas

A las resinas fenólicas (RF) se les conoce comúnmente como baquelitas o fenoplásticos. La baquelita fue la primera sustancia plástica totalmente sintética nombrada así en honor a su creador de origen belga Leo Hendrik Baekeland (1863-1944) que las desarrolló en los años 1908–1912.

Se obtienen haciendo reaccionar fenol y formaldehído en presencia de un catalizador ácido o básico. Las resinas fenólicas están conformadas por anillos aromáticos, unidos por el grupo metileno (figura 2). Las uniones del producto ocurren principalmente en la posición “*orto*” o “*para*” con los hidroxilos fenólicos. El alto grado de entrecruzamiento de la estructura molecular le confiere la propiedad de ser un plástico termoestable, es decir, que puede moldearse apenas concluida su preparación, pero una vez que se enfría no puede volver a ablandarse.

Poseen una amplia variedad de aplicaciones. Su mercado más importante se centra en polvos de moldeo, materiales de aislamiento térmico y adhesivos, en la fabricación de tableros, aglomerados y contrachapados. Esto supone un consumo de un 75 % del total de las resinas fenólicas producidas. El 32 % de las mismas se destina exclusivamente a la fabricación de adhesivos para la industria de tableros (Gardziella y col., 2000).

El consumo mundial de estos polímeros en el año 2001 alcanzó los 2.9 millones de toneladas métricas, lo que da idea de la importancia de este sector productivo (Greiner, 2002).

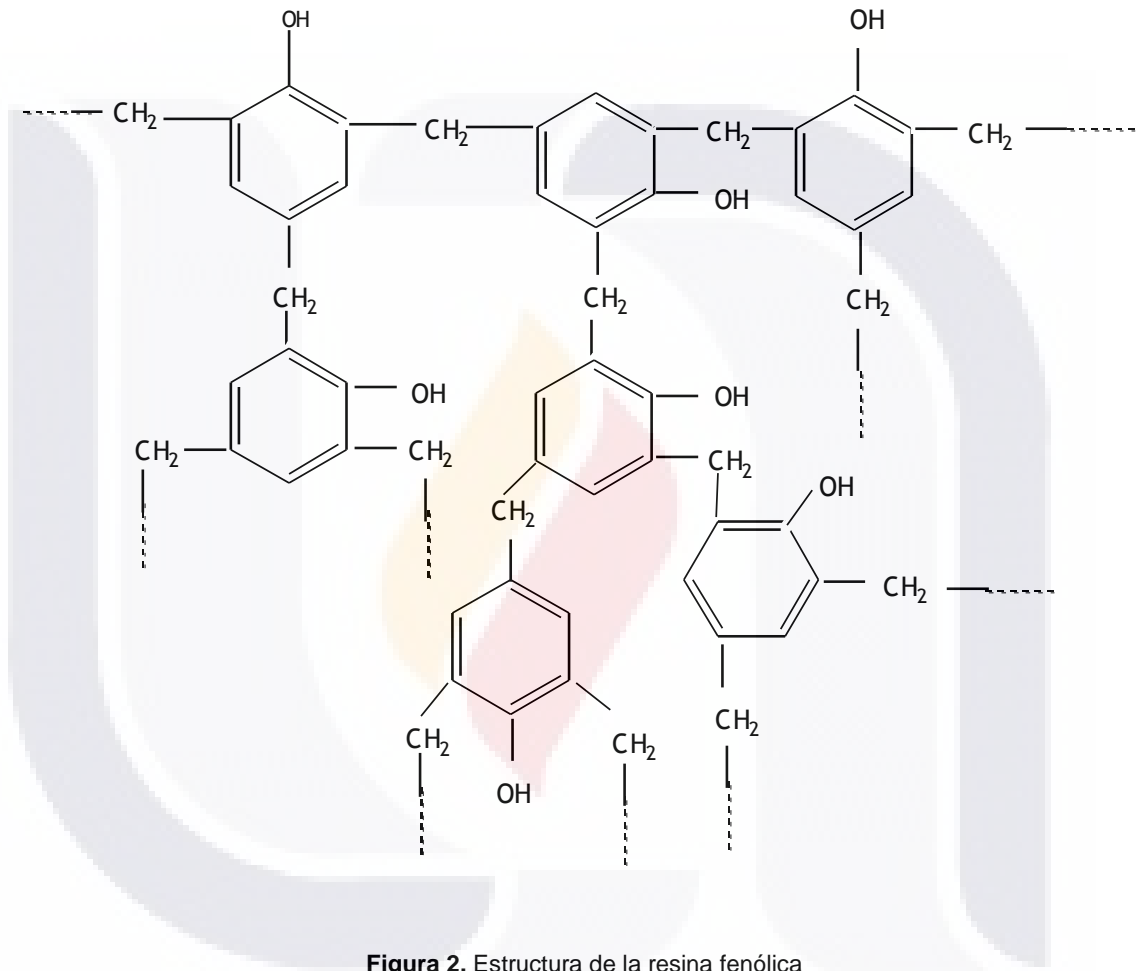


Figura 2. Estructura de la resina fenólica

Son excelentes aislantes, por lo general se usa en colores oscuros, marrones, negros, su combustibilidad es mala pues arde con gran dificultad, su permeabilidad a la luz está entre transparente a opaco. Con esta resina se moldean mangos de cacerolas, interruptores, clavijas, carcasas de radios, etc. (Montalvo, 2007).

### 1.2.1. Clasificación de las resinas fenólicas

Existen dos tipos de resinas fenólicas, los resoles y las novolacas.

#### 1.2.1.1. Resoles

Los resoles se obtienen cuando se usa un catalizador alcalino en la polimerización y la relación molar formaldehído:fenol es mayor a la unidad. El producto tiene uniones cruzadas entre las cadenas que permiten la formación de redes tridimensionales sin necesidad de añadir agentes endurecedores. De acuerdo al nivel de polimerización y el índice de entrecruzamiento se pueden distinguir 3 estados que son caracterizados por la apariencia de la resina y por su solubilidad:

- **Resol A:** Es el producto inicial de la condensación, es fundible a 55–60°C; es soluble en disolventes comunes: alcohol etílico, glicerina, bencina, acetona, etc.; puede ser líquido o semisólido de color amarillento más o menos claro.
- **Resol B:** Es un producto intermedio que se obtiene prolongando el calentamiento; es frágil, elástico en caliente, insoluble en acetona, capaz de ablandarse con el calor y pasar al estado plástico un limitado número de veces o estar en estado de suavidad por un periodo limitado.
- **Resol C:** Se presenta cuando se completa la polimerización por la aplicación de calor. El producto es infusible, insoluble en los disolventes ordinarios; inalterable a la acción del agua, aceite, los gases, la irradiación solar y tiene apreciables propiedades mecánicas y eléctricas (Weininger, 1988).

#### 1.2.1.2. Novolacas

Las novolacas se forman cuando se usan catalizadores ácidos, poseen una relación molar formaldehído:fenol menor a la unidad y todas sus cadenas finalizan

en una molécula de fenol. Aquí las cadenas no tienen uniones cruzadas por lo que el producto es permanentemente soluble y fundible y debido a esto, antes del proceso de curado se comportan como un polímero termoplástico. Algunos de ellos son solubles en aceite y son usados ampliamente en la formulación de pinturas, lacas y barnices. (Vigilante, 2005).

### 1.2.1.3. Nivel de producción nacional

La producción anual de resinas sintéticas en México durante el 2007 fue de 3 476 579 toneladas (SENER, 2007), de las cuales, aproximadamente, el 86% son termoplásticos y el resto resinas termofijas; de éstas, el 43% corresponde a las resinas fenólicas como se muestra en la figura 3 y el resto, son resinas epóxicas, poliéster, melanina y poliuretano que pertenecen a la misma categoría. Si se considera que la producción de RF en 2006 y 2007 fue de 19 487 y 17 091 toneladas respectivamente (INEGI, 2009), se puede tener una idea del nivel de contaminación de estos materiales al dejar de ser usados y llegar a los basureros o rellenos sanitarios.

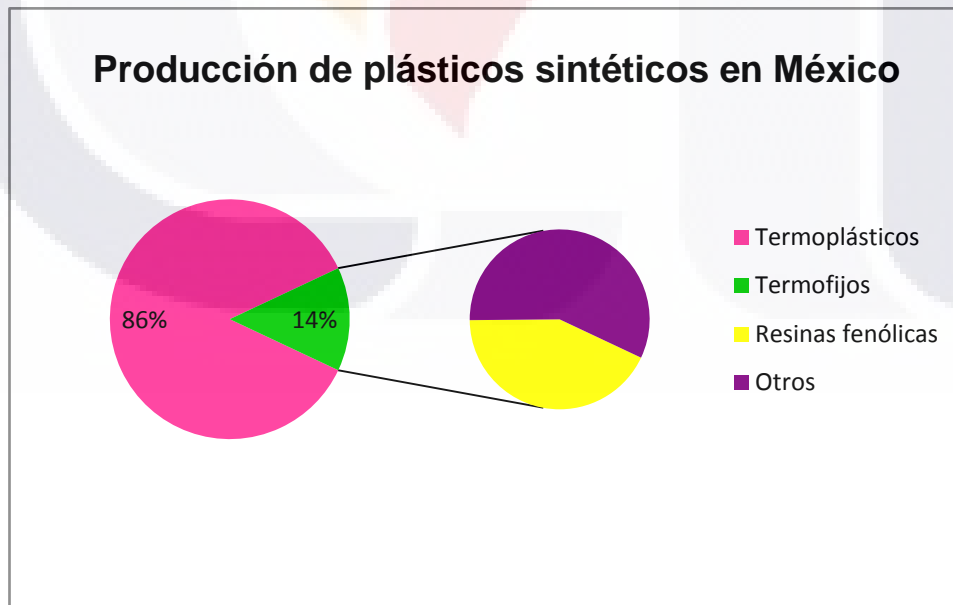


Figura 3. Producción de plásticos sintéticos en México (INEGI, 2009)



La producción de resinas fenólicas en México en el periodo de 2002 a 2007 se muestra en la figura 4. Se observa que las cifras de producción han ido disminuyendo año con año a partir de 2005, posiblemente debido a que se ha diversificado la cantidad de materiales disponibles para las mismas aplicaciones y/o que las importaciones han aumentado y los precios de éstas sean menores que las resinas nacionales, sin embargo, su producción es considerable.



Figura 4. Gráfica de producción de resinas fenólicas en México (INEGI, 2009)

En la actualidad, a nivel mundial, existe una problemática importante por la contaminación del agua, aire y suelo, ocasionada en gran medida, por los grandes volúmenes de residuos que se generan diariamente y que recibe escaso o nulo tratamiento adecuado. Entre el cúmulo de ventajas que ofrecen las materias plásticas existe el gran inconveniente de que no se degradan y permanecen intactas por un tiempo que nos es desconocido.

Si bien por sus características de peligrosidad, la mayoría de los plásticos sintéticos no representan un riesgo para el ambiente, sí son un problema mayor porque se degradan lentamente o simplemente no pueden ser degradados por el entorno, por lo que se acumulan. Al contrario de lo que ocurre con la madera, el

papel, las fibras naturales o incluso el metal y el vidrio, los plásticos no se oxidan ni se descomponen con el tiempo. Además su destrucción por calor puede generar sustancias químicas tóxicas que contaminan la atmósfera. Su eliminación es por lo tanto, un problema ambiental de dimensiones considerables.

Un método práctico para solucionar este problema es el reciclaje, sin embargo, no todos los materiales son susceptibles de someterse a este proceso (Cristán y col., 2003) como es el caso de las RF. Lo que hace de la resina una materia indestructible es su propia estructura química. El tamaño de las moléculas de los polímeros es tan grande que son muy pocas las reacciones químicas en las que intervienen. Por tanto, se busca transformar el polímero y reducirlo a unidades más pequeñas para que pueda sufrir la misma facilidad de degradación que la materia orgánica.

La descomposición de las RF, las cuales son altamente resistentes a la temperatura, pH extremos, alta humedad, radiación y corrosión es factible únicamente realizando la incineración del material, pero este proceso también genera emisiones contaminantes al ambiente.

La ciencia y la tecnología deben poner punto final al problema de los plásticos que ellas mismas han creado hace relativamente poco tiempo pero que ya han adquirido proporciones alarmantes (Biblioteca Salvat, 1975). Investigaciones recientes se han enfocado en tratamientos biológicos para tratar estos residuos y el desarrollo de plásticos degradables (Shah y col., 2008).

### **1.3. Biodegradación**

La biodegradación consiste en la capacidad de los microorganismos de convertir los compuestos complejos a sustancias elementales y los contaminantes a compuestos no tóxicos (Sodhi, 2000) y de este modo restablecer el flujo en los ciclos biogeoquímicos, por lo que este proceso representa otra alternativa para el manejo de los desechos de RF.

Muchos polímeros naturales, tales como la celulosa y las proteínas, son susceptibles al ataque microbiano. En contraste, los polímeros sintéticos de alto peso molecular son en general difíciles de degradar por microorganismos. La preocupación por el medio ambiente nos ha llevado a buscar alternativas para resolver el problema de la acumulación de desechos plásticos recalcitrantes en nuestro planeta (Iiyoshi, 1998).

Aunque buena parte de los estudios de descontaminación biológica se han centrado en la aplicación de bacterias, debido a la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos contaminantes más frecuentes de los suelos. (Martín y col., 2004).

Los hongos tienen una función vital en el saneamiento de los ecosistemas. Son los principales recicladores del planeta y los encargados de la restauración natural del hábitat ya que tienen la capacidad de descomponer moléculas complejas por lo que conociendo su potencial pueden llegar a ser los mejores agentes en la biorremediación.

Las enzimas y los ácidos que ellos secretan degradan moléculas complejas hasta compuestos simples. Todos los ecosistemas dependen de la capacidad de los hongos para descomponer materia orgánica y hacerla disponible. El resultado final de su actividad es regresar el carbono, hidrógeno, nitrógeno y minerales al ecosistema en la forma que puedan ser aprovechados por las plantas, insectos y otros organismos (Stamets, 2004).

### 1.3.1. Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos (HL), también llamados hongos de la podredumbre blanca, tienen la capacidad de degradar la lignina. Aunque existen algunos ascomicetos degradadores de lignina, los HL más eficaces se encuentran entre los basidiomicetos. Para ello, cuentan con una batería de enzimas extracelulares, oxidasas y peroxidasas, que contribuyen a despolimerizar la compleja estructura de la lignina. La oxidación y ruptura de la molécula de la lignina tiene la finalidad de permitir el acceso a los polisacáridos de la madera que constituyen una importante fuente de carbono y de energía.

La peculiar irregularidad estructural del polímero de lignina, hace que estas enzimas se caractericen por tener mecanismos de acción poco específicos que oxidan los anillos aromáticos constitutivos de dicho polímero. Las enzimas que participan en este proceso son: lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa dependiente de manganeso (MnP) y lacasa (Lac), una fenoloxidasa que contiene principalmente cobre. El patrón de expresión de esas actividades enzimáticas depende de los diferentes organismos.

La inespecificidad química y la intensa actividad oxidante de estas enzimas les otorgan una considerable capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina. Entre los diferentes xenobióticos que pueden ser transformados por hongos basidiomicetos se encuentran fundamentalmente los plaguicidas, hidrocarburos aromáticos (benzo( $\alpha$ )pireno, fenantreno, pireno, etc.) compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilospoliclorados) azocolorantes, etc.

Este sistema ligninolítico, ha demostrado ser muy versátil y atractivo para fines ambientales, porque puede servir para eliminar diversos contaminantes difíciles de degradar (Solís, 2005).

#### **1.4. Antecedentes de la biodegradación de resinas fenólicas**

La utilización de polímeros ha aumentado considerablemente en los últimos años dada su fácil obtención y los bajos costos que tienen en comparación con materiales de origen natural así como su diversidad de usos. De aquí surge la necesidad de estudiar la degradación de polímeros, ya que ahora se necesita reducir la cantidad de desechos que se generan por el uso de los materiales poliméricos y su poca compatibilidad con el ambiente. (Cristán y col., 2003)

Un buen número de plásticos se logran reciclar y muy pocos biodegradar por la acción de distintas especies de microorganismos. Desgraciadamente son varios los plásticos que no son biodegradables y no se reciclan. Este es el caso de las RF que hasta hace un poco más de seis años, no se tenía evidencia de su biodegradabilidad (Gusse y col., 2006).

La descomposición de este tipo de materiales sintéticos es factible únicamente realizando la incineración del material, es altamente resistente a la temperatura, pH extremos, alta humedad, radiación, a la corrosión y tiene excelentes propiedades aislantes. Debido a la importancia de estos plásticos en el mercado y su dispersión en el ambiente, es imperativo encontrar sistemas biológicos capaces de reciclar al ambiente estos compuestos contaminantes.

Existen escasos reportes referentes a la biodegradación de la RF empleando microorganismos (bacterias y hongos). Kaplan y col. en 1979 ensayaron 17 especies de hongos. La biodegradación de la RF fue muy escasa obteniendo porcentajes de 0 a 0.17 % en un periodo de 35 días. También ensayaron consorcios microbianos y los porcentajes de biodegradación fueron similares a pesar de que los tiempos de degradación se llevaron hasta 11 semanas, por lo que ellos concluyeron que estas resinas son altamente recalcitrantes.

Gusse y col. en 2006 fueron los primeros en reportar la primera evidencia de biodegradación de estas resinas por medio de hongos ligninolíticos que estaban consideradas como no biodegradables (Shimao, 2000). Entre este tipo de hongos *Phanerochaete chrysosporium* ha sido el más ampliamente estudiado. En dicho estudio se realizó únicamente un análisis cualitativo, pero no se cuantificó la biodegradación.

Sundarapandiyan y col. en 2010 reportaron la degradación por *Trametes versicolor* de una resina fenólica sulfonada lineal en bajas concentraciones, utilizada para el curtido sintético de pieles. Ellos detectaron cambios en los anillos aromáticos por medio del espectro de infrarrojo después de 8 días de incubación y midieron la actividad enzimática de polifenol oxidasa y Lac demostrando la biodegradabilidad de la resina aunque no experimenta la mineralización completa.

## 2. HIPÓTESIS

---

El sistema de enzimas producido por los hongos ligninolíticos que mineralizan la estructura de la lignina y otros compuestos orgánicos xenobióticos y recalcitrantes con estructura similar a la de las unidades monoméricas que la constituyen tendrán la capacidad de biodegradar al polímero sintético que conforma a las resinas fenólicas debido a la inespecificidad química y alto potencial oxidante de este sistema enzimático.

## 3. OBJETIVOS

---

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la biodegradación de las resinas fenólicas usando cepas de hongos ligninolíticos para disminuir su persistencia en el ambiente.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar la resina fenólica (RF) para utilizarla como sustrato para la biodegradación de las mismas.
- Ensayar las cepas de hongos ligninolíticos con que cuenta el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ingeniería Bioquímica para evaluar su capacidad de degradación de las RF.
- Establecer y estandarizar los métodos para la identificación de los productos de biodegradación de las RF.
- Identificar y cuantificar las principales actividades enzimáticas de los hongos ligninolíticos durante la biodegradación.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Cepas fungales:

Se trabajó con la colección de cepas de hongos ligninolíticos (HL) con que cuenta el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la UAA obtenida de la Universidad de Alberta, del Mold Herbarium (Edmonton, Canadá). (Tabla 1).

Tabla 1. Colección de cepas de hongos ligninolíticos

No.	Cepa	No.	Cepa
1	<i>Bjerkandera adusta</i> 4312	13	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 3642
2	<i>Bjerkandera adusta</i> 7308	14	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 4521
3	<i>Bjerkandera adusta</i> 8258	15	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725
4	<i>Pleurotus chiapas</i>	16	<i>Trametes versicolor</i> 8272
5	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7964	17	<i>Trametes versicolor</i> 8275
6	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7972	18	<i>Coriolopsis gallica</i> 8260
7	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7980	19	<i>Ganoderma applanatum</i> 8168
8	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7992	20	<i>Sporothrichum pulverulentum</i> 340
9	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7988	21	<i>Trametes hispida</i> 8269
10	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7982	22	<i>Trametes zonatus</i> 8158
11	<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC 58053	23	<i>Trametes hirsuta</i> 8165
12	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 3641	24	<i>Trametes trogii</i> 8156

### **4.1.2. Resina fenólica**

La RF utilizada se sintetizó en el laboratorio con la formulación típica de polimerización por etapas (Saechtling, 1995) la cual es representativa de los productos comerciales pero sin aditivos.

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Síntesis de resina fenólica**

En un vaso de precipitados se colocó formaldehído al 37% y fenol en proporción 1.25:1 con solución de NaOH al 1% para crear las condiciones alcalinas. Dentro de la campana de extracción de gases se calentó la mezcla en baño maría a 50° C sin dejar de agitar hasta que se disolvieron los cristales de fenol. Se aumentó la temperatura del baño a 70° C, se puso a reflujo y se continuó el calentamiento durante 1 hora.

Posteriormente se realizó el curado de la resina colocando el producto en una charola de teflón y se colocó en estufa durante 24 horas a 100° C; se dejó enfriar, y por último se lavó con agua para eliminar residuos de reactivos solubles.

Para el lavado se colocaron los trozos de RF en un vaso de precipitados de 2 L con agua destilada y se mantuvo en agitación constante durante periodos de 12 horas. Se cuantificó el fenol residual en el agua desecho por el método espectrofotométrico directo NMX-AA-050-SCFI-2001/9.3. Se repitió el procedimiento hasta que se logró que el agua de lavado no contuviera fenol después de permanecer en contacto con la RF. Luego se secaron las piezas de la RF, se pesaron, se envolvieron en papel aluminio y se esterilizaron durante 20 minutos a 121° C con calor húmedo.

#### **4.2.2. Determinación de fenol**

##### **Método espectrofotométrico directo para cuantificación de fenol**

##### **NMX-AA-050-SCFI-2001/9.3**

Para la curva de calibración se preparó una solución de fenol a concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g/mL}$  por triplicado. A cada una de las diluciones, blanco y a las muestras se les realizó el siguiente procedimiento:

A 10 mL de cada muestra en un tubo de ensaye se le añadieron 250  $\mu\text{L}$  de solución de amoníaco 0.5 N y 100  $\mu\text{L}$  de 4-aminoantipirina 2% P/V mezclando entre cada adición. Se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de solución de ferricianuro de potasio 8% P/V, se mezcló y se dejó reposar 15 minutos. Se transfirió a la celda del espectrofotómetro y se leyó la absorbancia a 510 nm. Se obtuvo la ecuación de la curva y se calculó la concentración de fenol en las muestras por interpolación.

#### **4.2.3 Obtención de espectro en el infrarrojo de la RF**

Para comprobar la polimerización, entrecruzamiento y naturaleza de la RF sintetizada en el laboratorio se obtuvo el espectro de infrarrojo en el rango de frecuencias entre 4000 y 650  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  usando un detector sulfato de triglicida deuterado (DTGS) en un espectrofotómetro, Nicolet-6700 FTIR (Thermo Scientific).

#### **4.2.4. Resiembra de cepas fungales**

Se realizó la resiembra de cada una de las cepas de colección cada 90 días en cajas Petri con 20 ml de medio agar papa dextrosa BD Bioxon (PDA) tomando 1  $\text{cm}^2$  de micelio de la caja de procedencia y se incubaron a 28°C durante 7-15 días. Posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4-7°C.

## **4.2.5. Ensayos de biodegradación de las RF**

### **4.2.5.1. Prueba preliminar**

La prueba se realizó en cajas Petri con 20 ml de medio agar malta al 1.5 y 3% respectivamente. En cada caja se colocó una pieza de RF la cual se pesó y esterilizó previamente y se inoculó con 1 cm<sup>2</sup> de micelio crecido en agar PDA de cada una de las cepas de la colección. Todas las cajas se incubaron a 28° C durante 30 días. Como control se colocó una caja que contenía la RF en el medio sin hongo y para cada cepa, otra con el hongo sin la RF con fines comparativos.

Se estuvieron realizando observaciones cada semana para vigilar el crecimiento del micelio sobre la resina y cambio en la coloración del medio de cultivo. Al final se tomaron fotografías de cada uno de los cultivos y se realizó la observación al microscopio óptico de la resina ensayada tiñéndola con azul de anilina en lactofenol. También se determinó su peso final para detectar pérdida de peso.

### **4.2.5.2. Ensayo de biodegradación de la RF con cultivo en placa**

Con las cepas que presentaron crecimiento, permanencia de micelio sobre la resina y cambio de color en el medio de cultivo se probaron las mismas condiciones anteriores durante 200 días de incubación y se incluyeron los testigos.

Concluido el periodo de incubación se obtuvieron los extractos para buscar posibles productos de degradación, la RF se recuperó para analizarla en el microscopio óptico (MO) y en el microscopio electrónico de barrido (MEB) y luego hidrolizar el micelio adherido con HCl 6 N por 12 horas con el objetivo de remover las hifas del hongo que penetraron en la RF, (Romero y col., 2007), se secaron en estufa a 40° C y posteriormente se determinó el porcentaje de pérdida de peso con respecto al inicial.

#### 4.2.5.3 Extracción de posibles productos de degradación

Al término del tiempo de incubación se extrajo la RF incluyendo el medio de cultivo y micelio desarrollado en esta sección; se colocó en un vaso de precipitados al que se le agregó 10 ml de mezcla acetonitrilo grado HPLC-agua en proporción 1:1 agitando frecuentemente. Se dejó reposar durante 1 hora y se decantó. Posteriormente se centrifugó el extracto a 17 000 rpm durante 10 minutos a 20° C y se filtró a través de una membrana con poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para inyectarse en el equipo de HPLC.

#### 4.2.5.4 Cinética de degradación utilizando *Bjerkandera adusta* 7308.

Se llevó a cabo el seguimiento de la biodegradación durante 40 días utilizando la cepa de *B. adusta* 7308 transfiriendo 1  $\text{cm}^2$  del hongo procedente de un cultivo previo en medio PDA a cajas Petri con medio Glucosa, malta y extracto de levadura (GMY) solidificado con 1.5% de agar y un fragmento estéril de RF. Los cultivos fueron incubados por duplicado a 28° C durante 10, 20, 30 y 40 días observando el crecimiento del micelio sobre los fragmentos de RF.

Los controles utilizados durante la cinética fueron

- El medio de cultivo empleado
- La RF en el medio sin el hongo
- El hongo inoculado en el medio de cultivo sin la RF.

Luego se procedió a la extracción de productos solubles al cabo de cada tiempo establecido y la RF se reservó para observarla en el microscopio óptico. Los extractos obtenidos fueron inyectados en el equipo de HPLC para detectar la presencia de productos de la degradación en función del tiempo.

Los extractos también fueron inyectados en el GC-MS para separar e identificar los productos de degradación formados. Previo a la inyección en el cromatógrafo de gases se realizó una nueva extracción haciendo una mezcla 1:1

de cada una de los extractos acuosos con cloruro de metileno para obtener un extracto orgánico. Además se determinó la actividad enzimática de Lac, LiP y MnP.

#### **4.2.6. Métodos de identificación de productos de degradación**

##### **4.2.6.1. Microscopía electrónica de barrido**

Se realizó la observación de la RF expuesta a los hongos ligninolíticos con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900 LV para evidenciar el proceso de biodegradación. Como testigo se usó la RF tratado en las mismas condiciones pero sin inocular.

- La muestra se deshidrató con etanol anhidro y se colocó dentro de un papel filtro para secarla naturalmente.
- Antes de hacer el montaje del material en el cilindro (stub) se puso sobre éste, un disco de grafito adherible de 1cm X 1cm.
- Enseguida se procedió a colocar con cuidado el material inorgánico en la posición deseada con el apoyo de un estereoscopio y pinzas para evitar dañarlo.
- Una vez montada la muestra en el cilindro, se colocó en el portamuestras del recubridor de oro (Denton Vacuum). La introducción de flujo de corriente a un tiempo estimado (de 80 a 150 segundos) hace que se desprendan partículas de oro del disco y se depositen en la muestra proporcionando un espesor de 100 Å<sup>0</sup>. Este recubrimiento es necesario para eliminar o reducir la carga eléctrica en la superficie de la muestra no conductora para obtener una buena imagen.
- La muestra se introdujo en la cámara del microscopio electrónico de barrido lista para ser observada.

#### 4.2.6.2 Separación de posibles productos de degradación utilizando HPLC

La separación de posibles productos de degradación en el extracto acuoso se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Shimadzu serie VP con detector de UV a 210 y 292 nm acoplado a columna nucleosilfenil 4.6 x 250 mm. La fase móvil fue metanol-agua en proporción 1:1 a un flujo de 0.5 ml/min. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L y el tiempo de corrida fue de 15 minutos.

#### 4.2.6.3 Separación e identificación de posibles productos de degradación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Los extractos orgánicos se inyectaron en el equipo Agilent technologies 6850 Network GC System y Agilent technologies 5975C VL MSD. Las condiciones de operación se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de operación del GC-MS

Cromatógrafo de gases		Espectrómetro de masas	
Columna HP-innowax		T cuadrupolo	150°C
Longitud	30 m	T fuente iones 230°C	
Diámetro interno	0.25 mm		
Film	0.25 mm		
Temperatura inyector	280° C		
Temperatura columna	70-270° C		
Temperatura detector	300° C		
Volumen de inyección	1 $\mu$ L		
Gas Helio	2 ml/min		
Tiempo	14 min		

#### 4.2.6.4 Determinación de actividad enzimática lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa.

Se determinó la actividad enzimática en extractos obtenidos agregando 10 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 5 a las cajas donde creció *B. adusta* 7308 en contacto con la RF.

Para medir actividad de Lac se utilizó el regulador de acetatos 100mM pH 5, siringaldazina (4-hidroxi-3,5 dimetoxibenzaldehído) 0.8 mM disuelto en metanol y el extracto enzimático. Se midió la cinética a 525 nm durante un minuto. El coeficiente de extinción es de  $E_{525} = 65\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Jaszek y col., 2006)

Para medir actividad LiP se utilizó el regulador de succinatos 40 mM pH 4, alcohol veratrílico 40 mM, extracto enzimático y peróxido de hidrógeno 0.4 mM. Se midió la producción de veratril aldehído a 310 nm. El coeficiente de extinción es de  $E_{310} = 9300\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . (Tien y Kirk, 1988).

Para la MnP dependiente se utilizó el regulador de malonato de sodio 50 mM pH 4.5, sulfato de manganeso 1 mM, extracto enzimático y peróxido de hidrógeno 0.1 mM. Se midió la formación del complejo malonato  $\text{Mn}^{+3}$  a 270 nm. El coeficiente de extinción es de  $E_{270} = 11590\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . (Wariishi y col., 1992).



## 5. RESULTADOS

---

### 5.1 Síntesis de la resina fenólica

Se realizó la síntesis de resina fenólica en el laboratorio con la formulación típica reportada por Saechtling (1995), para contar con el material suficiente para realizar los ensayos de biodegradación libre de aditivos como colorantes, rellenos o endurecedores. Se obtuvo un material sólido, rígido y duro, de color entre amarillo y café claro con rendimiento de 0.6 gr de resina/gr de fenol utilizado. Se lavaron y pesaron fragmentos de aproximadamente 100-200  $\mu$ gr, se envolvieron en papel aluminio y se esterilizaron a 121° C durante 15 minutos para eliminar cualquier microorganismo presente y someterlos a biodegradación con los hongos ligninolíticos.

Para eliminar el fenol residual en la RF sintetizada se realizaron lavados con agua y se determinó el contenido de fenol en el agua de desecho utilizando la metodología propuesta en la Norma NMX-AA-050-SCFI-2001/9.3.

Para determinar la concentración de fenol se utilizaron los datos de la curva de calibración obtenida por triplicado que se muestra en la tabla 3 y se obtuvo la ecuación de la recta con índice de correlación de 0.9987 (figura 5).

Ecuación utilizada para interpolar

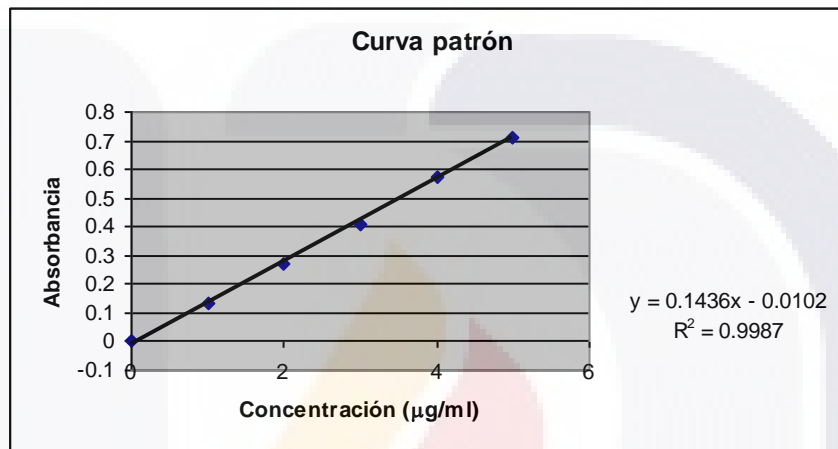
$$x = \frac{y + 0.0102}{0.1436}$$

Dónde: x = concentración de fenol ( $\mu$ g/mL)

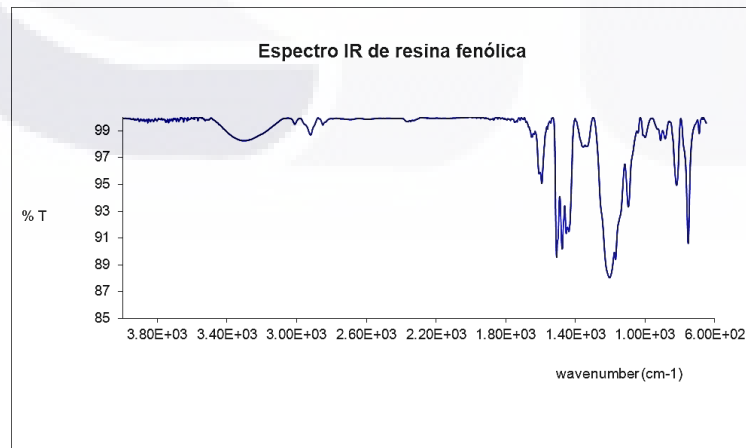
y = Absorbancia

**Tabla 3.** Datos para curva de calibración para fenol

Concentración de fenol ( $\mu\text{l/mL}$ )	Absorbancia 510nm
0	0 *blanco
1	$0.131 \pm 0.002$
2	$0.270 \pm 0.001$
3	$0.406 \pm 0.006$
4	$0.573 \pm 0.002$
5	$0.713 \pm 0.009$

**Figura 5.** Gráfica de curva patrón de fenol

El recambio de agua y la medición por el método espectrofotométrico se realizó cada 12 horas y a medida que transcurrió el tiempo, la concentración de fenol disminuyó hasta no detectarse. Fue necesario realizar 5 recambios de agua.

**Figura 6.** Espectro de IR de RF sintetizada en el laboratorio.

Se obtuvo el espectro de IR de la RF sintetizada en el laboratorio y se comparó con el reportado por Scheirs, 2000 para confirmar la polimerización y semejanza con las resinas tipo resol comprobándose que la resina obtenida corresponde a la baquelita (figura 6).

## 5.2 Resiembra de cepas fungales

La resiembra de cepas de la colección de hongos ligninolíticos se realizó con la finalidad de preservar las cepas, mantener su pureza, viabilidad y características morfológicas durante la investigación (Iiyoshi y col., 1998).

## 5.3 Ensayo de biodegradación de la RF

### 5.3.1 Prueba preliminar

Las observaciones de la prueba preliminar para evaluar las cepas de HL como degradadores de las RF se reportan en la tabla 4 en la que se señala si hubo crecimiento del hongo sobre la resina y si se generó cambio de color en el medio de cultivo.

En la mayoría de los casos hubo crecimiento de micelio sobre la resina, pero en algunas cajas fue muy evidente el cambio de coloración en el medio de cultivo alrededor del fragmento de la RF, señaladas en la tabla de color rojo y con negritas. Las figuras 7-11, que corresponden a las cepas de *Phanerochaete chrysosporium* 4521 y *Coriolopsis gallica* 8260, muestran el cambio de color en el medio de cultivo que no se presenta en la caja control, la cual contiene únicamente el medio de cultivo y la resina estéril (Figura 7). La misma apariencia se observó en los cultivos de *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992, *Sporothrichum pulverulentum* 340, *Trametes hispida* 8269 y *Trametes trogii* 8156.

**Tabla 4.** Observaciones de ensayo de prueba para la degradación de Rf por medio de HL.

No.	Cepa	Caja 1	Caja 2	Caja 3
1	<i>Bjerkandera adusta</i> 4312	+	+	+
2	<b><i>Bjerkandera adusta</i> 7308</b>	+	+§	+
3	CONTROL			
4	<i>Pleurotus Chiapas</i>	+§	+	+
5	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7964	+	+§	+
6	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7972	+§	+	+
7	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7980	+	--	+
8	<b><i>Pleurotus ostreatus</i> 7992</b>	+	+§	+§
9	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7988	+	+§	+
10	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7982	--	+	+
11	<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC 58053	+§	+	+
12	<b><i>Phanerochaete chrysosporium</i> 3641</b>	+	+§	+§
13	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 3642	+	--	+§
14	<b><i>Phanerochaete chrysosporium</i> 4521</b>	+§	+	+§
15	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	+§	+§	--
16	<i>Trametes versicolor</i> 8272	+§	+	+
17	<i>Trametes versicolor</i> 8275	+§	--	+
18	<b><i>Coriolopsis gallica</i> 8260</b>	+§	+§	+§
19	<i>Ganodermaaplanty</i> 8168	--	--	+
20	<b><i>Sporothrichum pulverulentum</i> 340</b>	+§	+§	+§
21	<i>Trametes hispida</i> 8269	+§	+	+
22	<i>Trametes zonatus</i> 8158	--	--	+
23	<i>Trametes hirsuta</i> 8165	+	--	--
24	<b><i>Trametes troggi</i> 8156</b>	+§	+§	+§

+ micelio sobre la resina

§ cambio de color en el medio

-- sin crecimiento



**Figura 7.** RF en medio de cultivo (control)



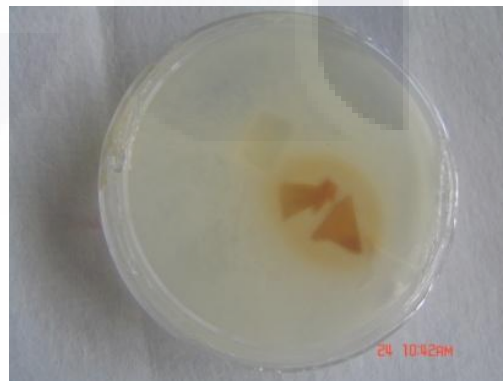
**Figura 8.** Cultivo de *P. chrysosporium* 4521 con RF (anverso)



**Figura 9.** Cultivo de *P. chrysosporium* 4521 con RF (reverso)



**Figura 10** Cultivo de *C. gallica* 8260 con RF (anverso)



**Figura 11** Cultivo de *C. gallica* 8260 con RF (reverso)

Las observaciones en el microscopio óptico también evidencian los cambios en la RF. Las figuras 12 y 13 muestran micrografías 10X de la RF que estuvo en contacto con *P. chrysosporium* 4521 después de 30 días de incubación, donde se muestra la invasión del micelio en la resina, presenta bordes carcomidos y cambio en la textura superficial.



**Figura 12.** RF en contacto con *P. chrysosporium* 4521 10x



**Figura 13.** RF en contacto con *P. chrysosporium* 4521 10X

### 5.3.2 Ensayo de biodegradación con cultivo en placa

Con esta información, se seleccionaron las cepas que presentaron mayor crecimiento sobre la resina y cambio de coloración en el medio debajo de ella. Las cepas escogidas se reportan en la tabla 5 y se inocularon en caja Petri con medio agar malta similar a la prueba anterior y se incubaron por 200 días para observar por MEB las transformaciones generadas por los hongos ligninolíticos, así como realizar la extracción de posibles productos de degradación.

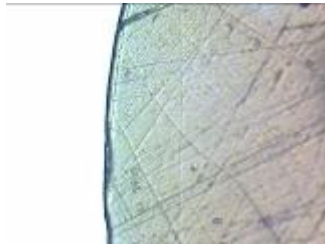
**Tabla 5.** Cepas seleccionadas para observación en MEB.

No.	Cepa
2	<i>Bjerkandera adusta</i> 7308
8	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7992
11	<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC 58053
13	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 3642
14	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 4521
16	<i>Trametes versicolor</i> 8272
18	<i>Coriolopsis gallica</i> 8260
20	<i>Sporothricum pulverulentum</i> 340
21	<i>Trametes hispida</i> 8269
24	<i>Trametes trogii</i> 8156

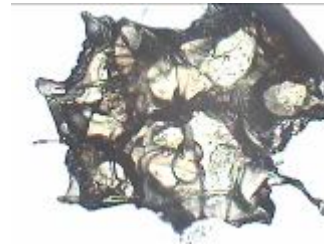
La tabla 6 muestra las cepas que presentaron pérdida de peso en el periodo de 30 y 200 días cultivados en placa sobresaliendo *P. ostreatus* seguida por *P. chrysosporium* 4521. Después de 200 días de incubación se pudo comprobar que en los fragmentos donde hubo mayor pérdida de peso, *B. adusta* 7308, *P. ostreatus* 7992 y *P. chrysosporium* 4521 hubo cambio en la textura, formación de zonas traslúcidas y poros que no se presentan en el control (Figuras 14 y 15) o en los fragmentos donde no hubo cambio en el peso como en *T. trogii*.

**Tabla 6.** Pérdida de peso después de 30 y 200 días de incubación

	Cepa fúngica	% de cambio	No.
	<b>CONTROL (MEDIO CON RESINA)</b>	<b>0.0 ± 0</b>	<b>0.0 ± 0</b>
2	<i>Bjerkandera adusta</i> 7308	1.6 ± 0.3	4.3 ± 0.2
7	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7992	2.4 ± 0.1	5.1 ± 0.3
11	<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC 78053	0.8 ± 0.09	0.8 ± 0.002
14	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 4521	1.0 ± 0.2	6.3 ± 0.2
15	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	2.1 ± 0.3	2.1 ± 0.2
17	<i>Trametes versicolor</i> 8272	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.3
20	<i>Sporothricum pulvurulentum</i> 340	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1



**Figura 14.** Fragmento de RF Control



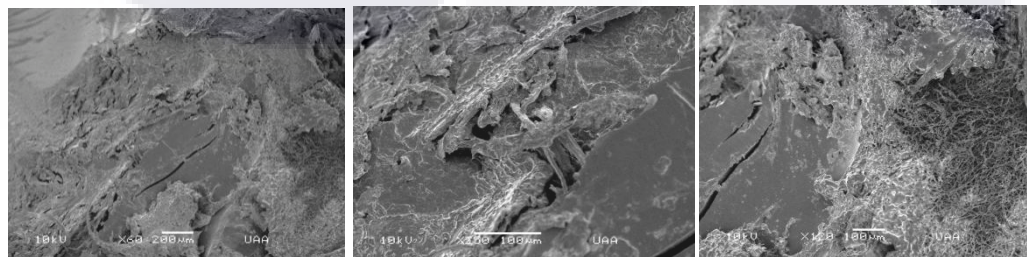
**Figura 15.** Fragmento de RF en contacto con *P. ostreatus* 7992

#### 5.4 Observaciones en microscopio electrónico de barrido (MEB) de los fragmentos de la RF expuestos a los hongos para su biodegradación.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó la extracción de los compuestos de las RF, expuestas a las cepas fungales seleccionadas (tabla 5) y se procesaron para ser observadas en el MEB. Las imágenes se presentan en las figuras 16-20. A continuación se mencionan las principales características de las resinas después de la biodegradación con cada cepa fungal.

- *Bjerkandera adusta* 7308

Zonas de degradación evidente, espacios moteados, reducción gradual del espesor, invasión del hongo, fractura de resina en algunas zonas (figura 16).

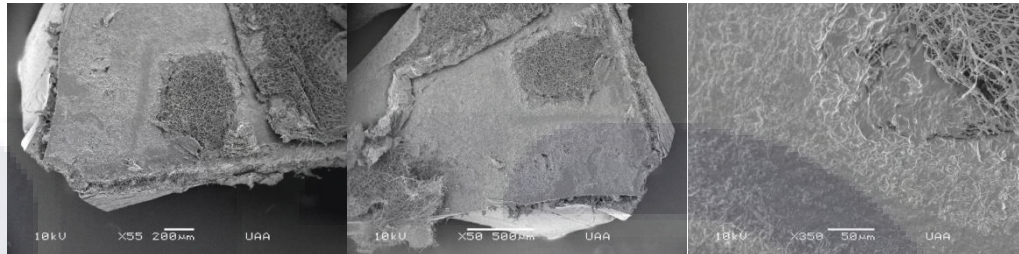


**Figura 16.** Microfotografías en SEM de la RF tratada con *B. adusta* 7308



- *Pleurotus ostreatus* 7992 y *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053

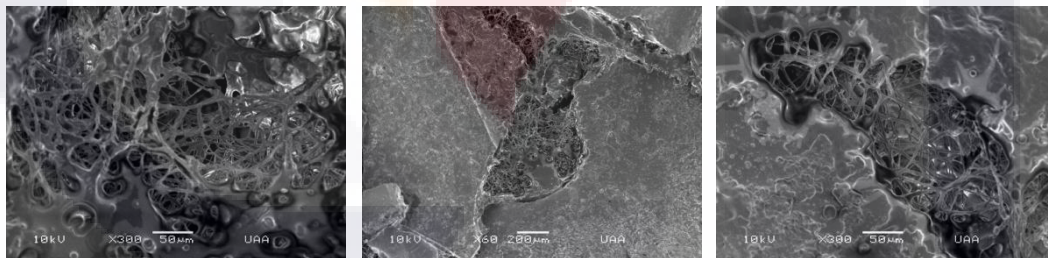
Invasión de micelio, disminución de espesor en zonas de crecimiento, degradación evidente, perforaciones en los costados (figura 17).



**Figura 17.** Microfotografías en SEM de la RF tratada con *P. ostreatus* 7992

- *Phanerochaete chrysosporium* 3642 y *Phanerochaete chrysosporium* 4521

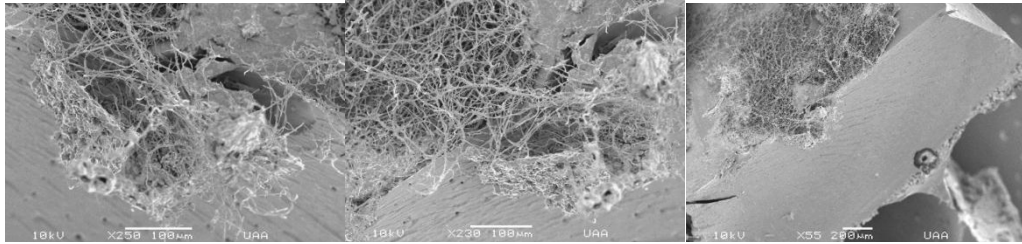
Zonas moteadas, residuo claro en la superficie, penetración de micelio en la resina, regiones de degradación evidente, formación de poros en la superficie (figura 18).



**Figura 18.** Microfotografías en SEM de la RF tratada con *P. chrysosporium* 4521

- *Trametes versicolor* 8272

Formación de surcos o ranuras sobre la resina, penetración de micelio en la resina, zonas de degradación evidente y cambio en la consistencia de la resina, formación de poros e invasión de micelio (figura 19).



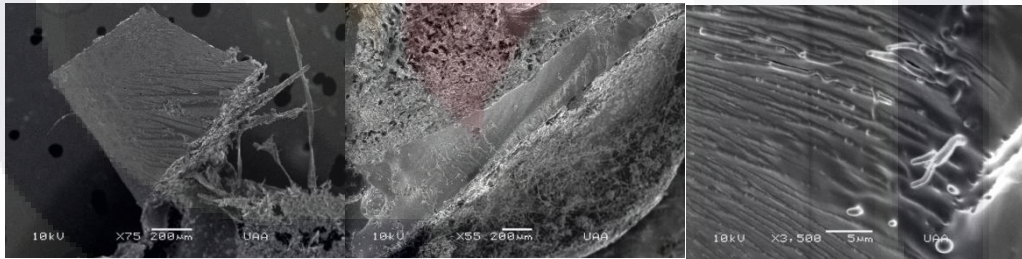
**Figura 19.** Microfotografías en SEM de la RF tratada con *T. versicolor* 8272

- *Corioloopsis gallica* 8260

Zonas de degradación evidente por el cambio de consistencia en bordes. Formación de ranuras y poros con residuo claro, cambio de consistencia en la resina y bordes devastados.

- *Sporotrichum pulverulentum* 340

Formación de ranuras por el micelio, bordes devastados, cambio de consistencia en la resina (Figura 20).



**Figura 20.** Microfotografías en SEM de la RF tratada con *S. pulverulentum* 340

- *Trametes hispida* 8269

Formación de ranuras en la superficie, bordes devastados, penetración de micelio en la resina, cambio de consistencia y formación de fibras color claro.

- *Trametes trogii* 8156

Fractura de resina, formación de ranuras y poros, el hongo penetra al interior de la superficie y cambia la consistencia de la resina. El micelio forma las ranuras.

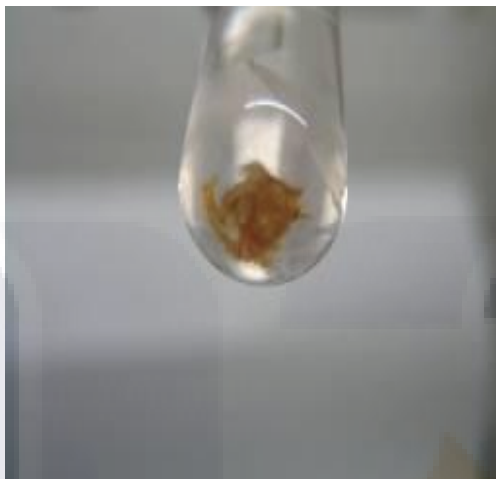
## 5.5 Extracción y separación posibles productos utilizando HPLC

Se obtuvieron los extractos de las RF incubadas en placa con medio agar-malta al 3% con la finalidad de disolver los posibles productos de degradación generados por el contacto del micelio con la RF; los cuales fueron incoloros. La extracción se llevó a cabo con una solución acetonitrilo grado HPLC al 50% ya que éste permite la disolución de compuestos polares y apolares.

En el caso de las RF incubadas en placa con medio agar malta al 3% con *B. adusta* 7308, *P. ostreatus* 7992 y con *P. chrysosporium* 4521 se observó un cambio en la textura de la resina al introducirla en el agua de lavado después de obtener el extracto (Figuras 21 y 22) y al agitarla vigorosamente se fragmentó por completo (Figuras 23 y 24). Esto no ocurrió con las RF que no perdieron peso.

Los extractos obtenidos de los cultivos de las cepas seleccionadas en contacto con la RF y sus respectivos controles se inyectaron en el equipo HPLC para separar los posibles compuestos solubles derivados de la biodegradación.

Para visualizar mejor los cambios, se realizaron empalmes de los cromatogramas obtenidos en los extractos del hongo crecido con la RF y el control (hongo crecido sin la presencia de RF) con el fin de detectar diferencias (Figuras 25-27), donde se observan la presencia de picos que revelan la formación de nuevos productos.



**Figura 21.** Lavado de las RF en contacto con *P.chysosporium* 4521



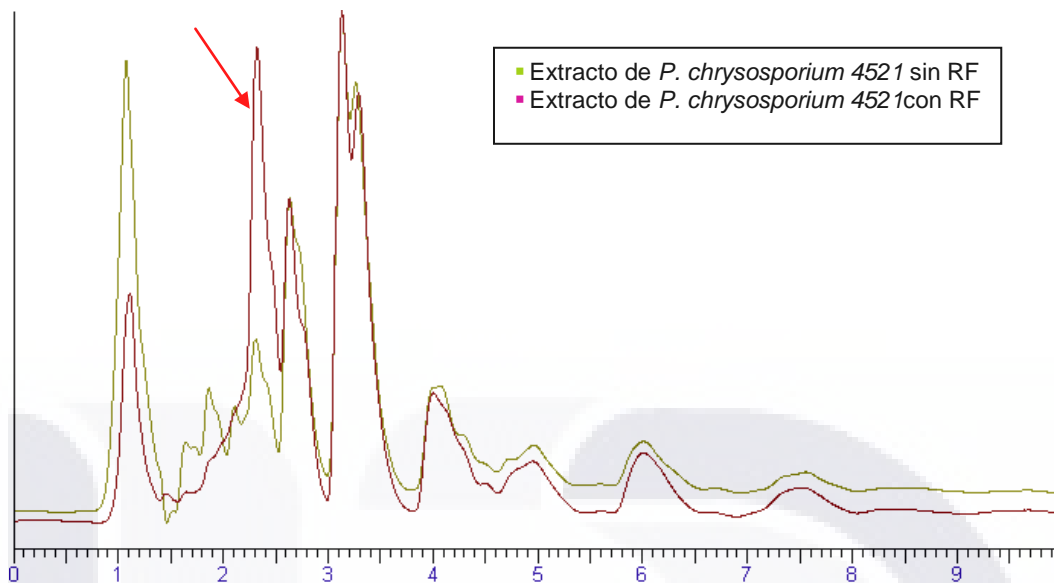
**Figura 22.** Lavado de las RF en contacto con *P. ostreatus* 7992



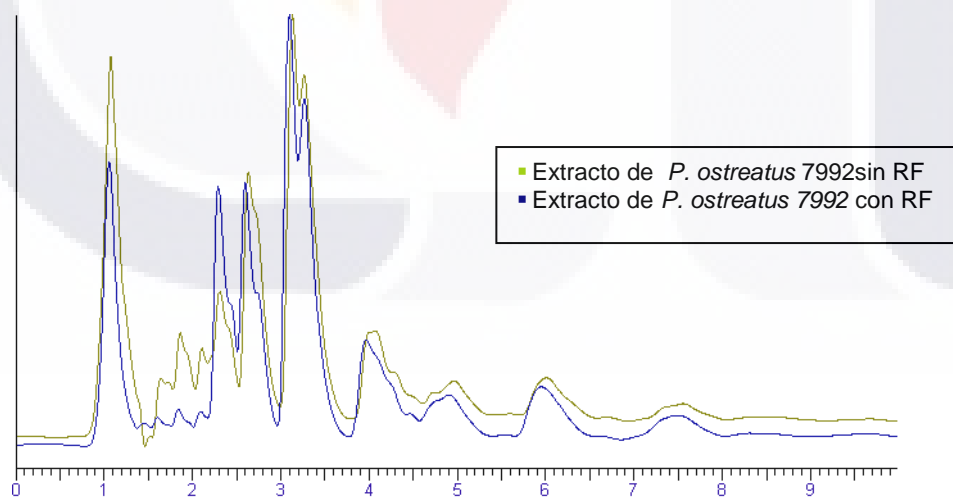
**Figura 23.** Desintegración de las RF en contacto con *P. ostratus* 7992



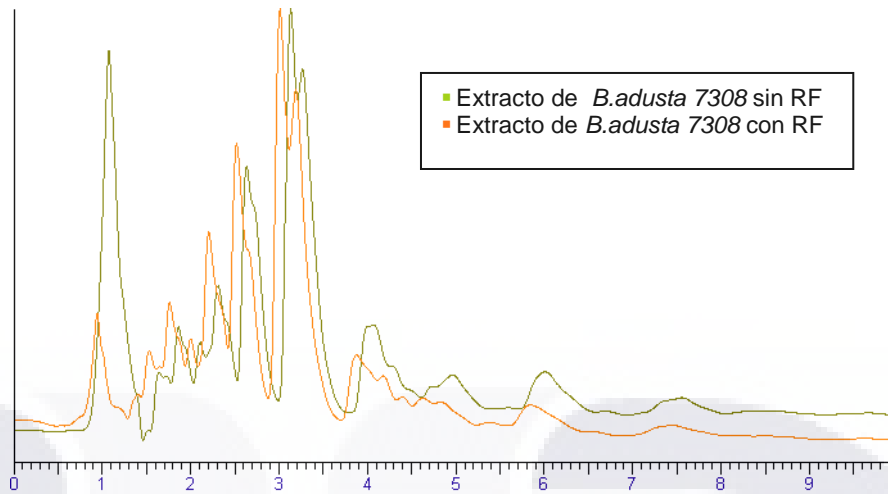
**Figura 24.** RF en contacto con *P. chysosporium* 4521



**Figura 25.** Cromatogramas de extractos de medio de cultivo *P. chrysosporium* 4521 con y sin la RF



**Figura 26.** Cromatogramas de extractos de medio de cultivo *P. ostreatus* 7992 con y sin la RF.



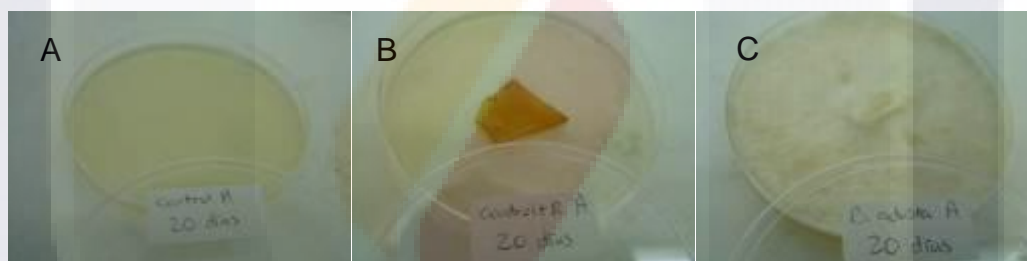
**Figura 27.** Cromatogramas de extractos de medio de cultivo *B. adusta* 7308 con y sin la RF.

De los extractos de las muestras inyectadas se observan diferencias con respecto al control en el extracto de *P. chrysosporium* 4521 (Figura 25) y *P. ostreatus* 7992 (Figura 26). Por lo contrario en el extracto de *B. adusta* 7308 no se observan cambios (Figura 27), similarmente en el extracto de *T. versicolor* 8272 y *T. trogii* 8156. Sin embargo, los fragmentos de la RF que se mantuvieron en contacto con *B. adusta* 7308 muestran mayores cambios en su superficie y pérdida de dureza, lo cual puede indicar que el sistema usado para la extracción no fue el adecuado o los productos de la biodegradación pudieron difundir al medio.

De las cepas seleccionadas para este estudio, las que mayores cambios físicos presentaron fueron *B. adusta* 7308, *P. ostreatus* 7992 y *P. chrysosporium* 4521 y aunque el cromatograma de *B. adusta* 7308 no presentó diferencias con el control a largo plazo (figura 27), el crecimiento de la biomasa sobre la RF presentó mayor persistencia y se mantuvo con apariencia más activa que las otras dos cepas por mayor tiempo por lo que fue seleccionada para realizar una cinética de degradación en un periodo de cuarenta días con intervalos de diez días cada uno para identificar productos de degradación y evidenciar la biodegradabilidad de las RF.

## 5.6 Cinética de degradación utilizando *Bjerkandera adusta* 7308

Para darle seguimiento a la biodegradación se inocularon cajas con medio GMY y RF con *B. adusta* 7308. Se utilizó este medio de cultivo para disminuir la interferencia de componentes del medio con la detección de los posibles productos de degradación. Se hicieron extracciones cada diez días en un periodo de cuarenta días. Los controles utilizados durante la cinética fueron el medio de cultivo empleado (Figura 28A), un trozo de RF en el medio sin el hongo (Figura 28B) y *B. adusta* 7308 inoculado en el medio de cultivo sin el trozo de RF (Figura 28C). Todos los controles se mantuvieron en incubación durante los tiempos establecidos al igual que las cajas que contenían la RF en contacto con el hongo para asegurar que estuvieron sometidos a las mismas condiciones.



**Figura 28.** Controles utilizados durante la cinética después de 20 días de incubación. A) medio de cultivo, B) medio de cultivo y resina, C) medio de cultivo y *B. adusta* 7308.

La figura 28B muestra que la resina no produce ningún cambio al medio de cultivo al ponerse en contacto en las condiciones de incubación. La figura 28C refleja que después de 20 días el crecimiento del micelio es uniforme en toda la superficie de la caja Petri aunque desde los 5 días de incubación ya estaba totalmente poblada de micelio.

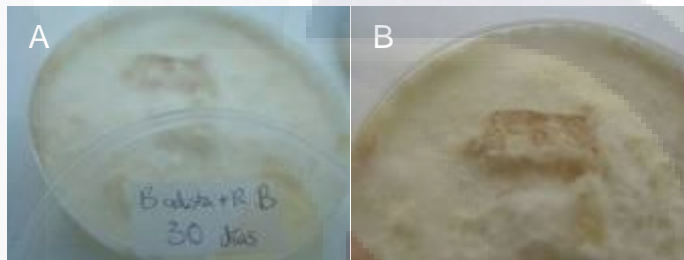
Las figuras 29-32 muestran como el micelio crece sobre la resina durante todo el periodo de incubación sin generar inhibición sobre la superficie y se mantiene a lo largo del tiempo establecido para la extracción.



**Figura 29.** Cultivo de *B. adusta* 7308 y la RF después de 10 días de incubación.



**Figura 30.** Cultivo de *B. adusta* 7308 y la RF después de 20 días de incubación.



**Figura 31.** A) Cultivo de *B. adusta* 7308 y la RF después de 30 días de incubación, B) Acercamiento en el trozo de RF.



**Figura 32.** A) Cultivo de *B. adusta* 7308 y la RF después de 40 días de incubación, B) Acercamiento en el trozo de RF.

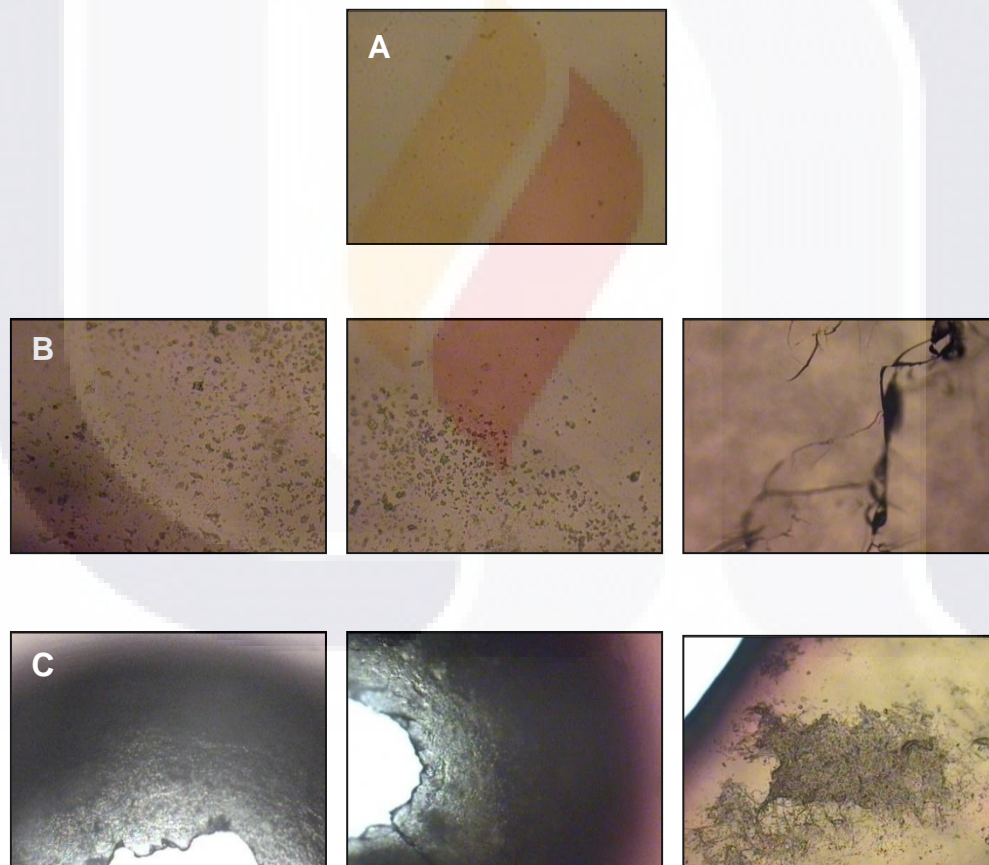
La figura 33 es una fotografía que muestra el fragmento de la RF control y la figura 34 corresponde a microfotografías que demuestran como el crecimiento y contacto del micelio sobre la superficie de la RF después de 40 días afectó la estructura superficial de la RF al presentarse formación de hendiduras y fisuras (figura 34B), que no se observan en el control que corresponde a la RF en el medio de cultivo sin hongo donde se percibe una superficie totalmente lisa (figura 34A).



Las áreas más afectadas son los bordes de la RF (figura 34C) donde se observa disminución en el grosor y cambio de color debido a que esta superficie ha permanecido más tiempo en contacto con el micelio y en la figura 34D se observa la colonización de *B. adusta* 7308 en la superficie de la RF.



**Figura 33.** Fotografía de la RF control después de 40 días de incubación.

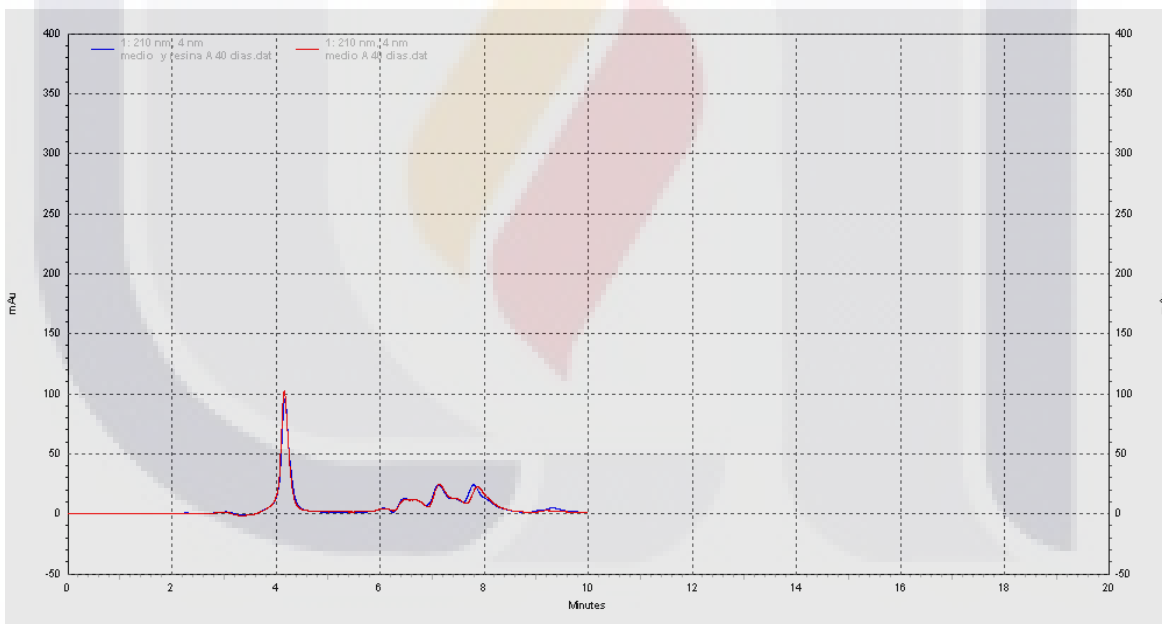


**Figura 34.** Microfotografía 10X de la RF después de 40 días de incubación. A) Control. B) Superficie de la RF en contacto con *B. adusta* 7308. C) Bordes de la RF en contacto con *B. adusta* 7308. D) Micelio de *B. adusta* sobre la RF

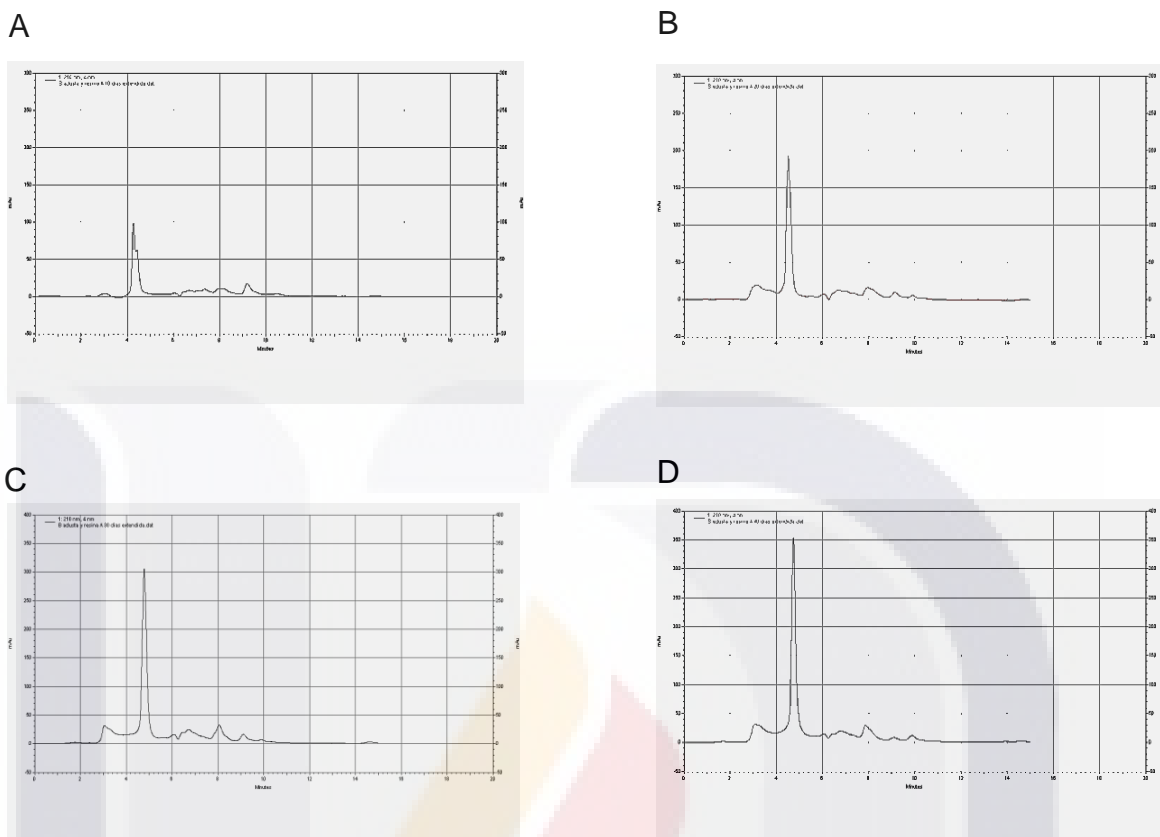
## Separación posibles productos de degradación utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Los extractos acuosos fueron centrifugados y filtrados para ser inyectados en el equipo de HPLC. Se obtuvieron los cromatogramas de los controles y de los extractos de la RF colonizados por el hongo, después de 10, 20, 30 y 40 días a 210 nm.

La figura 35 muestra los cromatogramas del extracto del medio de cultivo empleado (GMY sólido) y el medio de cultivo en contacto con la resina, donde se aprecia que al no haber diferencia, la RF no aporta ningún componente adicional a la composición del medio de cultivo cuando se sometió a las condiciones de incubación y por lo tanto se puede utilizar como referencia.

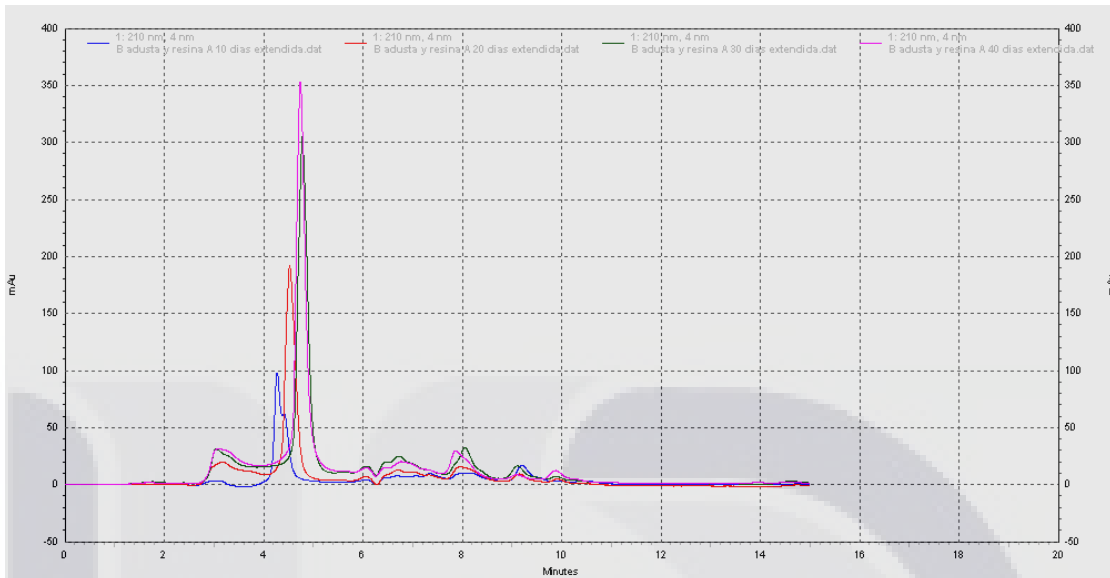


**Figura 35.** Cromatograma del extracto del medio de cultivo (rojo) y el cromatograma del extracto del medio de cultivo en contacto con la RF (azul) después de 40 días de incubación.



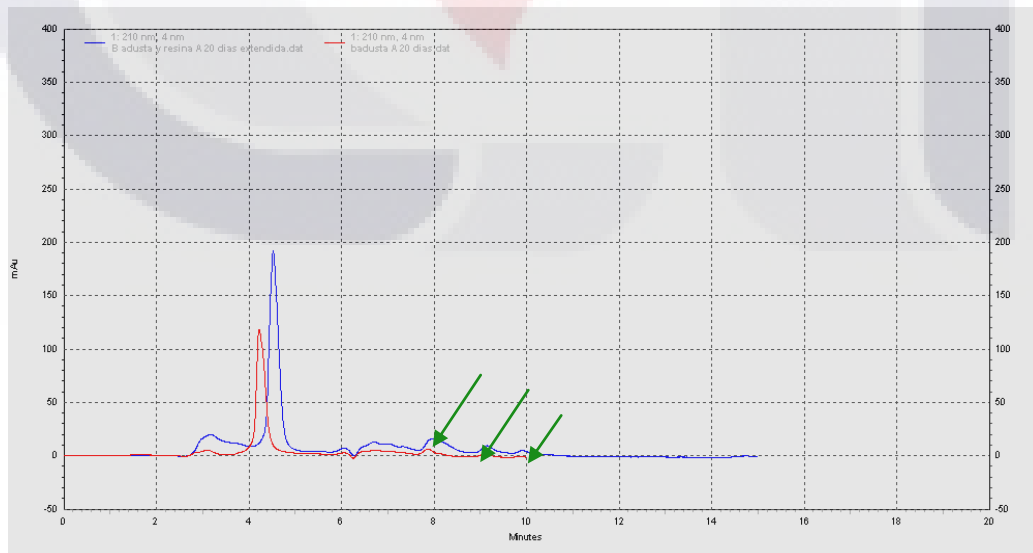
**Figura 36.** Cromatogramas de extractos de la RF en contacto con *B. adusta* 7308 después de 10 días (azul), 20 días (rojo), 30 días (verde) y 40 días (morado) de incubación.

La figura 36(A-D) presenta los cromatogramas de los extractos después de 10, 20, 30 y 40 días de incubación. Aquí se puede percibir que a medida que transcurre el tiempo hay cambios en los productos del metabolismo de *B. adusta* 7308. Para apreciarlos mejor en la figura 37 se muestran los 4 cromatogramas, donde se observa que en este periodo se producen compuestos nuevos y que va aumentando su concentración en función del tiempo por lo que estos extractos fueron inyectados en el equipo GC-MS para su identificación.



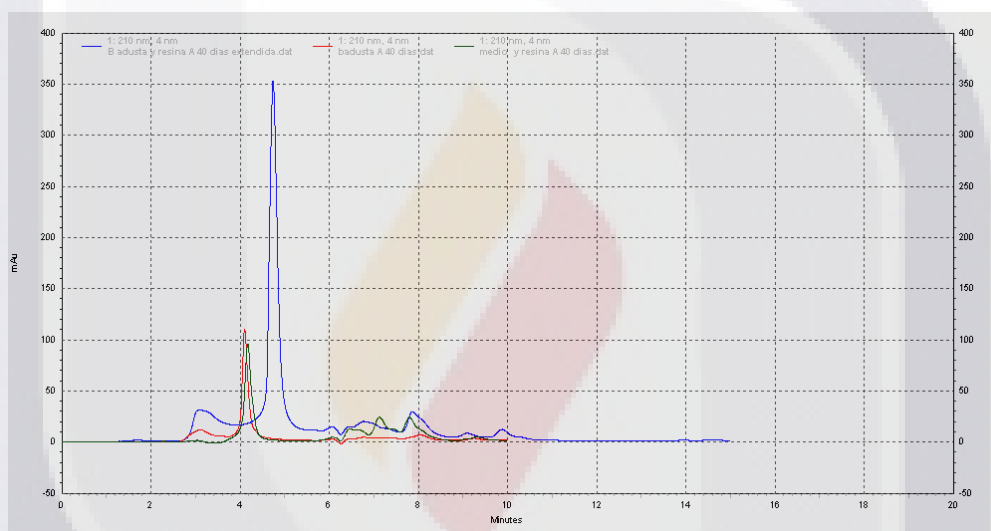
**Figura 37.** Cromatogramas de los extractos después de 10, 20, 30 y 40 días de incubación con *B. adusta* 7308.

También se compararon los cromatogramas del extracto del cultivo de *B. adusta* 7308 sin RF con el que si lo contenía después de 20 días de incubación (Figura 38), en donde se observa que la presencia de la RF favorece la formación de nuevos compuestos que se separan a los 8, 9 y 10 minutos lo cual confirma que están ocurriendo cambios en la RF.



**Figura 38.** Cromatogramas de extracto de *B. adusta* 7308 sin la RF (rojo) y extracto de la RF en contacto con *B. adusta* 7308 (azul) después de 20 días de incubación.

La figura 39 muestra la comparación de los cromatogramas de los controles (extracto del medio de cultivo con resina y micelio de *B. adusta* 7308 con el cromatograma del extracto de la RF en contacto con *B. adusta* después de 40 días de incubación. Después de un mayor tiempo se observa el agotamiento de los componentes del medio de cultivo cuando el hongo está creciendo pero sin que se produzcan sustancias nuevas detectables a 210 nm (rojo) con respecto al medio intacto (verde), en cambio cuando la RF estuvo en contacto con el micelio (azul) se detecta la presencia de sustancias nuevas en el extracto a los 6, 9 y 10 minutos.



**Figura 39.** Cromatogramas de extracto del medio de cultivo con la RF (verde), micelio de *B. adusta* 7308 sin la RF (rojo) y la RF en contacto con *B. adusta* 7308 (azul) después de 40 días de incubación.

### **Separación e identificación de posibles productos de degradación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

La obtención de una fase orgánica usando cloruro de metileno de cada uno de los extractos que se inyectaron en el GC-MS fue debido a que se detectó la presencia de azúcares residuales por lo que únicamente los compuestos afines al cloruro de metileno fueron inyectados para su separación e identificación. La comparación de los cromatogramas de los extractos del medio de cultivo y el

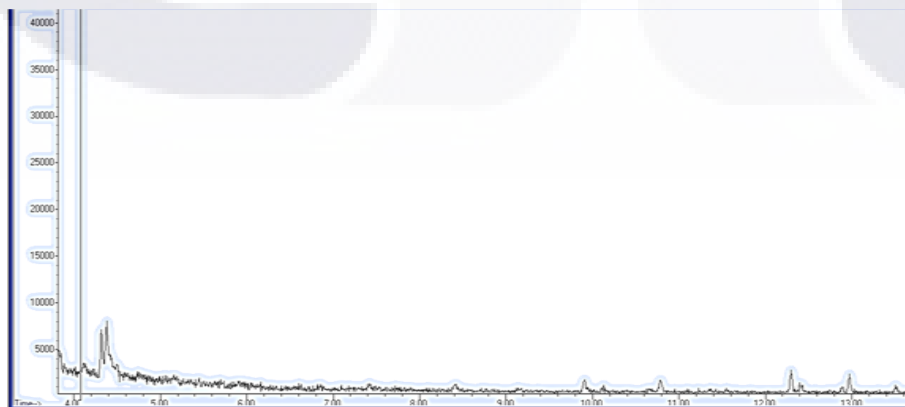
medio de cultivo con la RF (controles) de las figuras 40 y 41 son iguales y no contienen sustancias disueltas que generen señal en la longitud de onda evaluada, por lo que las diferencias que se puedan detectar son originadas por el metabolismo del hongo o por la biodegradación de la RF.



**Figura 40.** Cromatograma del extracto del medio de cultivo (control)

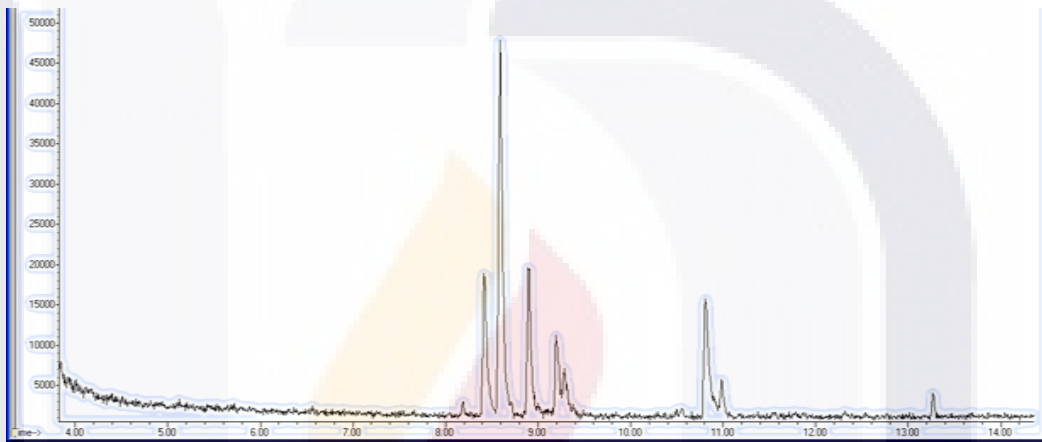


**Figura 41.** Cromatograma del extracto del medio de cultivo con la RF (control)

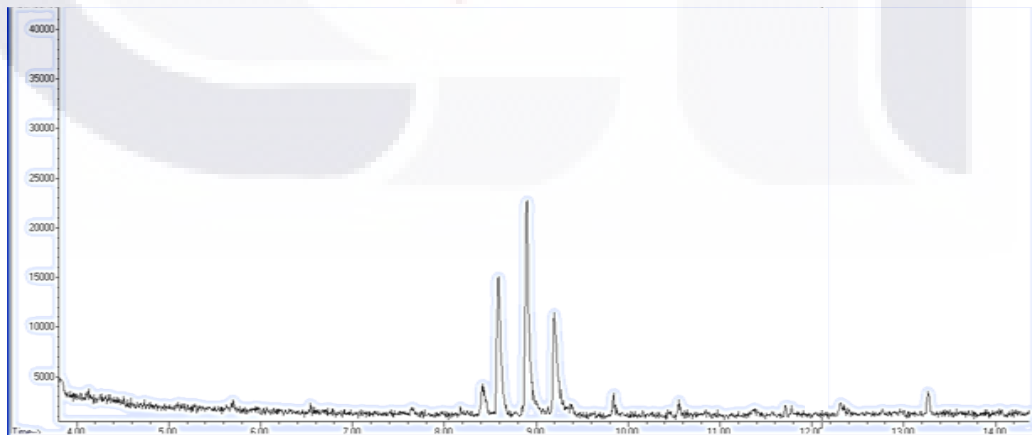


**Figura 42.** Cromatograma del extracto de *B. adusta* 7308 cultivado en el medio después de 20 días de incubación.

La figura 42 presenta el cromatograma del extracto de *B. adusta* 7308 crecido en el medio después de 20 días de incubación, donde se observan algunos picos relacionados con el metabolismo del hongo, sin embargo, en la figura 43 y 44 aparecen nuevas sustancias ante la presencia de la RF después de 20 y 40 días de incubación, respectivamente y que no se observan en los controles y varían con respecto al tiempo.



**Figura 43.** Cromatograma del extracto de *B. adusta* 7308 crecido en el medio con la RF después de 20 días de incubación.



**Figura 44.** Cromatograma del extracto de *B. adusta* 7308 crecido en el medio con la RF después de 40 días de incubación.

La identificación de los principales compuestos aromáticos separados utilizando la biblioteca NIST, con que cuenta el equipo en base a los espectros obtenidos (Figura 45) corresponde a alcohol veratrílico (9.1 min), veratraldehído (8.9 min) y o-hidroxidifenil (8.4 min). El alcohol veratrílico está reportado como mediador natural, el cual es producido por los hongos ligninolíticos para aumentar tanto la eficiencia de la degradación como el tipo de sustratos susceptibles de ser oxidados (Torres y col., 2003). Mientras que el veratraldehído es el producto de la oxidación del alcohol veratrílico (Haemmerly y col., 1986).

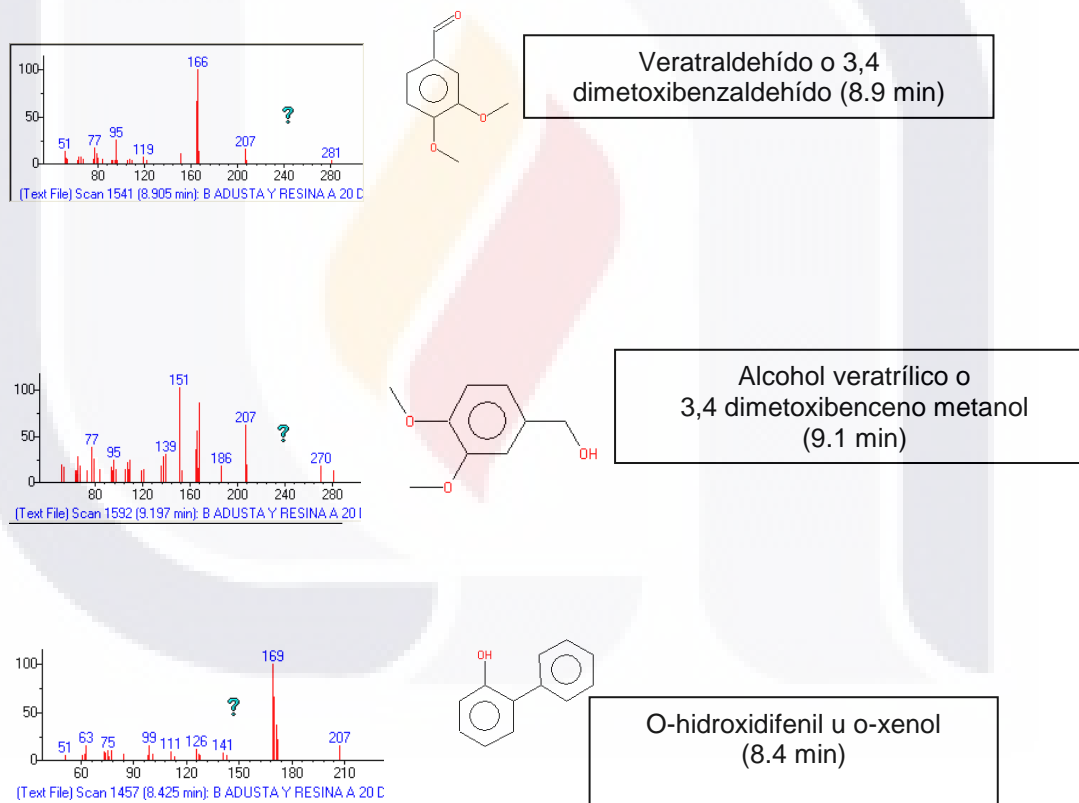


Figura 45. Identificación de los principales compuestos detectados utilizando la biblioteca NIST



### **Determinación de actividad enzimática Lac, LiP, y MnP en la cepa *B. adusta* 7308.**

Se ha reportado que *Bjerkandera adusta* 7308 produce LiP, MnP y Lac (Ward y col., 2004) por lo que se determinó las actividades de estas enzimas a los 15 días de incubación para demostrar su presencia en los extractos extracelulares. La actividad Lac no fue detectada mientras que LiP y MnP presentaron una actividad de 64.52 U/mL y de 794.65 U/mL respectivamente. La actividad ligninolítica de las enzimas detectadas es un factor determinante del proceso de biodegradación y la detección del alcohol veratrílico y veratraldehído por GC-MS confirman que se está llevando a cabo un proceso de oxidación.

## 6. DISCUSIÓN

---

La contaminación ambiental por desechos de polímeros sintéticos ha sido reconocida como un problema grave. Con el fin de apoyar el desarrollo sustentable en el mundo, este problema debe ser atendido (Ikada 1999, Shimao 2001) de aquí surge la necesidad de estudiar la degradación de polímeros, debido a que actualmente se necesita reducir la cantidad de desechos que se generan por el uso de este tipo de materiales y su poca compatibilidad con el ambiente (Cristán y col., 2003, Zheng y col., 2005).

Los microorganismos juegan un rol significativo en la descomposición biológica de materiales, incluyendo polímeros sintéticos en el medio ambiente (Seneviratne y col, 2005). En los últimos años se ha desarrollado un gran interés por el uso de los hongos de la pudrición blanca con propósitos de biorremediación debido a sus sistemas enzimáticos ligninolíticos, que también degradan un amplio grupo de contaminantes ambientales. Aunque inicialmente la atención se centró en *Phanerochaete chrysosporium*, especies de otros géneros han mostrado potencial para la biorremediación, (Barr y col. 1992).

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la biodegradación de las RF usando cepas de HL para disminuir su persistencia en el ambiente considerando que el sistema de enzimas producido por estos hongos tendrán la capacidad de biodegradar al polímero sintético que conforma a las resinas fenólicas debido a la inespecificidad química, la intensa actividad oxidante de este sistema y a la similitud que tiene la lignina (sustrato natural de estos hongos) con la de la resina fenólica.

Las RF se obtienen combinando fenol con formaldehído y el calor que se aplica durante el curado favorece la polimerización; el producto tiene uniones cruzadas entre las cadenas formando redes tridimensionales (figura 2) por lo que

se clasifican dentro de los plásticos termoestables dando un producto final generalmente duro, fuerte y resistente al calor (Cristán y col. 2003). El recalentamiento no ablanda estos materiales y si la aplicación de calor continúa, la pieza llega a carbonizarse directamente por lo cual no son susceptibles para el reciclado y al terminar su vida útil se convierten en un desecho que se acumula y contamina el ambiente. Debido a la importancia comercial y al problema ambiental que generan estos compuestos surgió la necesidad de buscar alternativas para su degradación.

### **6.1 Síntesis de resina fenólica**

La formulación empleada para la síntesis de la RF en el laboratorio representa los productos comerciales sin aditivos para poder darle seguimiento a la biodegradación (Gusse y col. 2006) aunque puede haber mucha variabilidad por las condiciones en que se realiza la polimerización. Los principales factores que influyen en el producto final son el tipo de catalizador empleado, relación molar aldehído:fenol, tiempo y temperatura de curado (Wakeman, 1947, Poljansek y col., 2005).

El proceso se llevó a cabo por la secuencia de tres reacciones: la adición de formaldehído al fenol, el crecimiento de la cadena o formación del prepolímero y finalmente la reacción en el curado donde ocurre el entrecruzamiento (Seymour y col, 1995). Las dos primeras etapas se llevaron a cabo durante el proceso de calentamiento a 70° C. La primera etapa es una reacción de adición donde el formaldehído se une al fenol; en este punto, la mezcla de reacción se mantuvo en estado líquido y sin color. La segunda y tercera etapa son reacciones de condensación y cuando se realizó la polimerización lineal que corresponde a la segunda etapa se observó un cambio de color a naranja claro. Con el curado a 100° C en la estufa se realiza la tercera etapa, la mezcla se endureció y se obtuvo una placa de color café claro con apariencia cristalina, textura dura y resistente como se muestra en la figura 34.

Durante el curado ocurrió el entrecruzamiento puesto que con el calentamiento se originaron cadenas transversales debido a que cierta proporción de fenol es capaz de enlazarse a otras moléculas adyacentes en más de dos lados, en este caso, la posición *orto* y *para* del fenol, permitiendo así la adición de otras moléculas ramificadas y a medida que el polímero logró un alto encadenamiento transversal adquirió una estructura de red constituyendo una macromolécula. Esta es la causa de que el polímero fije su estructura química y fragüe de manera irreversible (Groover, 1997).

El lavado de la RF se realizó con la finalidad de eliminar los residuos de reactivos después del curado para asegurar que los hongos actúen sobre el polímero formado y no sobre las materias primas. Para ello se realizaron lavados consecutivos y se determinaron fenoles en el agua de desecho por el método espectrofotométrico directo NMX-AA-050-SCFI-2001/9.3.

La concentración de fenol de la muestra se obtuvo por interpolación con una curva de calibración (0-10 mg/L) como se muestra en la figura 5. El fenol se empleó como patrón y el resultado obtenido corresponde a la concentración de este compuesto en la muestra. El principio de este método consiste en que los compuestos fenólicos reaccionan con la 4-aminoantipirina a pH básico y en presencia de ferricianuro potásico, forma un compuesto coloreado de antipirina susceptible de una determinación espectrofotométrica a 510 nm. El pH elevado permite evitar interferencias en la coloración que se dan a pH 8 por lo que es muy importante asegurar estas condiciones (Clesceri y col., 1989).

La determinación se realizó hasta que los fenoles no fueron detectados en agua que contiene la RF por lo que se puede considerar que la muestra es insoluble. Cada fragmento fue esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 minutos para eliminar la presencia de microorganismos. Para demostrar que la resina sintetizada es una RF se obtuvo el espectro de IR y en base a lo reportado por Scheirs, 2000 se compararon los principales picos de los grupos funcionales y todos logran coincidir.

El espectrómetro de infrarrojo sometió la muestra a radiación en el rango de número de onda de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Aunque esta radiación es débil e incapaz de causar una alteración permanente en una molécula, suministra energía suficiente para que sus enlaces vibren. La ventaja de esta medición es que dependiendo de los distintos enlaces y grupos funcionales presentes, la molécula solo absorbe las frecuencias que poseen exactamente la energía que se requiere para causar una vibración y éstas se registran en un gráfico. (Bailey y col. 1998).

La literatura reporta valores de números de onda característicos de las RF y estas señales son útiles para identificar los componentes de la reacción de condensación del fenol y el formaldehído y la estructura de estos compuestos. El pico en 3400  $\text{cm}^{-1}$  es característico del estiramiento por los grupos OH, el pico de 1370  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del O-H en el plano, el pico en 1610  $\text{cm}^{-1}$  es atribuido a la vibración C=C del producto aromático que no se presenta en el fenol. Además en el espectro de las RF las señales características de la vibración del puente metileno en 1460 y 1480  $\text{cm}^{-1}$ ; la vibración C-O-C del puente metileno éter en 1116  $\text{cm}^{-1}$  están presentes (Poljansek y col., 2005).

## 6.2 Ensayo de biodegradación de RF

Se realizó una prueba preliminar con todas las cepas de HL con la finalidad de seleccionar a las que tuvieran potencial para ser usadas en la degradación de la RF. El enfoque básico del ensayo consistió en hacer crecer cada una de las cepas de HL por triplicado sobre medio agar malta 3% con un fragmento de la resina con el propósito de observar si los hongos tenían la capacidad de colonizar la RF y generaban cambios en el color del medio de cultivo en la zona circundante a la resina así como la pérdida de peso. Se compararon con los testigos que consistieron en la RF en el medio de cultivo sin inocular y además el crecimiento de cada hongo en el mismo medio de cultivo pero sin la resina.

Como se observa en la tabla 4 hubo cepas en las que no hubo crecimiento sobre la RF como fue el caso de *T. zonatus* mientras que en otras como *P.*

*chrysosporium* 4521 y *C. gallica* 8260, entre otras, que además de crecer sobre la RF generaron un halo color café alrededor de la RF (figuras 8-11) que no se observaron en los controles lo que implica que los HL que presentaron estos cambios están relacionados con la transformación de este material.

El metabolismo microbiano de un sustrato causa cambios en él. Si el sustrato es grande e insoluble en agua las mediciones físicas son usadas comúnmente para evaluar el ataque microbiano. Estos métodos incluyen el examen microscópico, medición de pérdida de peso o medición de la pérdida de fuerza mecánica. A medida que la biodegradación continúa pequeñas moléculas individuales son liberadas y el análisis químico de monómeros y productos de mineralización pueden ser detectados (Fedorak, 2005) por lo que se procedió de esta manera para probar la biodegradación de las RF.

Las observaciones en el microscopio que se muestran en las figuras 12 y 13 confirman que el crecimiento del micelio sobre el trozo de la RF afecta su estructura, especialmente en los bordes donde el micelio tuvo la capacidad para penetrar, colonizar y alterar el trozo de resina sintética y se confirma con la pérdida de peso después de 30 días que varió desde 0.8 hasta 6.3% en las cepas ensayadas (tabla 6).

Estos cambios no prueban la presencia de un proceso de biodegradación en términos de metabolismo pero los parámetros de cambios visuales pueden ser usados como un primer indicador de cualquier ataque microbiano (Shah y col, 2008), por lo que en base a estos criterios se seleccionaron las cepas para continuar con la investigación (tabla 5).

### **6.3 Observaciones en microscopio electrónico de barrido (SEM) de los fragmentos de la RF ensayados en la biodegradación**

Después de 200 días de incubación en que el micelio de las cepas seleccionadas (tabla 5) permaneció colonizando la RF, se realizó la extracción para ser observado a través del MEB. Al realizar la separación de las RF sometidas a biodegradación se observó un cambio en su apariencia física, especialmente en cuanto a la rugosidad.

A través del MEB fue posible observar que las hifas produjeron zonas moteadas, surcos y zonas de evidente degradación en la superficie de la RF que gradualmente fueron reduciendo su espesor, formando poros o bien ocasionaron que los fragmentos colapsaran y presentaron fracturas (Figuras 16-20). El crecimiento y la permanencia del micelio sobre la superficie y la penetración en cualquier irregularidad encontrada o generada en la RF permitió considerar que las hifas jugaron un papel importante en el proceso. Sin embargo, en la muestra testigo se observa una superficie lisa, tersa y compacta. Este mismo comportamiento se reporta como mecanismo de degradación de la lignina (Jennings *et al.* 1999) por lo que debido a las similitudes en la composición de ambos polímeros puede presentarse un proceso de degradación semejante.

Gusse y col. (2006) reportaron la primera evidencia de biodegradación de RF con hongos de la podredumbre blanca presentando una microfotografía de MEB después de 28 días de incubación con *Phanerochaete chrysosporium* donde se aprecia la degradación del material (principalmente debido al número de aumentos). Sin embargo, no es tan clara como las imágenes que se presentan en este trabajo donde se muestra tanto el crecimiento del micelio como el daño que éste le causa a la RF.

De manera simultánea, con las réplicas de cada cepa fue determinada la pérdida de peso de las muestras. Mientras que las RF colocadas en medio de cultivo únicamente (control) no sufrieron cambios, las RF en contacto con las

cepas seleccionadas incrementaron la pérdida excepto *P. ostreatus* 78053 y *P. chysosporium* 24725 que no aumentó el porcentaje de pérdida (tabla 6), comprobándose que transcurrido un periodo de tiempo mayor, el peso continúa decreciendo lo que confirma la biodegradación de las RF.

Kaplan y col. (1979) reportaron que la velocidad de descomposición de la lignina en suelo es de 2 a 15 % durante un mes y en cultivos axénicos con hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca de hasta el 7 %; por lo que la pérdida de peso de estos polímeros sintéticos es más lenta pero no despreciable.

#### **6.4 Extracción y separación de posibles productos de degradación de la RF utilizando HPLC**

Al realizar la separación de las RF del medio de cultivo y proceder a su lavado transcurrido el tiempo de incubación se percibió un cambio en la textura del material y al ser sometido a agitación vigorosa algunos de los trozos se fragmentaron totalmente (Figuras 21-24), por lo que el material se volvió más frágil después de estar en contacto con los HL lo que puede ser considerado como un indicador del ataque fungal, aunque esto no demuestre que se trata de un proceso de degradación en términos del metabolismo.

Durante la degradación de los polímeros de alto peso molecular por medio de microorganismos es necesario primeramente obtener sus monómeros para poderlos mineralizar en el interior de las células. La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para pasar a través de las membranas celulares por lo que se deben depolimerizar para poder ser absorbidos y biodegradados dentro de la células. Se ha reportado que el crecimiento de algunos tipos de hongos puede causar la hinchazón y la fractura del material conforme el micelio penetra en el polímero sólido y por la acción de las enzimas obtenerse los unidades más pequeñas para poderse metabolizar (Shah y col., 2008).



La hidrólisis es la reacción principal para iniciar la degradación de polímeros sintéticos y participan activamente enzimas extracelulares para crear grupos funcionales hidrofílicos. De este modo, el aumento de la solubilidad en el medio de los compuestos hidrolizados de menor peso molecular permite transportarlos al interior de la célula para metabolizarlos internamente (Shah y col. 2008). Debido a la complejidad de las RF dada por su estructura reticular únicamente con la acción de enzimas extracelulares actuando sobre el polímero es que se puede metabolizar y la hidrólisis inicial se debe dar en el exterior liberando compuestos solubles por lo que con la finalidad de extraer los posibles productos de degradación después de 30 días de incubación, la RF y el medio de cultivo circundante se disolvieron en una mezcla acetonitrilo agua 1:1 y para detectarlos se utilizó HPLC.

En los cromatogramas obtenidos (figuras 25 y 26) que corresponden a las cepas *P. chrysosporium* 4521 y *P. ostreatus* 7992 se observaron picos nuevos a 2.4 minutos y un pequeño cambio en 2.8 minutos que no pudo resolverse en las condiciones de elución aplicadas, sin embargo, por los tiempos de retención deben corresponder a monómeros liberados de la RF. En el extracto de la RF incubada en el medio de cultivo no fueron detectados estos picos por lo que su presencia en los extractos que estuvieron en contacto la RF con el hongo es atribuible a productos de degradación. El cromatograma correspondiente a *B. adusta* 7308 (figura 27) no presentó cambios, sin embargo, debido a la pérdida de peso, los cambios observados en MEB y principalmente a persistencia del micelio sobre la resina fue seleccionada para darle seguimiento en intervalos de tiempo más cortos y buscar los productos de biodegradación para identificarlos.

### **6.5 Cinética de degradación utilizando *Bjerkandera adusta***

Los cultivos fueron realizados en medio GMY solidificado con agar y se incubaron junto con los controles para utilizarlos como referencia. La presencia de la RF en el medio no tiene efectos de inhibición en *B. adusta* 7308 ni afecta la velocidad de crecimiento (figuras 28-32) por lo que se puede considerar que el

proceso que se lleva a cabo es cometabolismo, es decir, la transformación de un compuesto llamado cosustrato, en este caso la RF, en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento. El cosustrato no aporta energía, carbono o algún otro nutriente y en consecuencia es incapaz de soportar la replicación celular y para ello se requiere del sustrato (García y col., 2008). El fundamento de este fenómeno consiste en que las enzimas que posee un microorganismo potencialmente degradador pueden no tener una especificidad demasiado estricta, es decir, una misma enzima puede degradar distintos compuestos. De este modo se iniciaría la degradación de un compuesto que no sustenta el crecimiento del organismo en cuestión.

Bajo este principio se realizó la cinética incubando la RF con el hongo *B. adusta* 7308 durante 40 días en periodos de 10 días cada uno incluyendo los controles para separar e identificar los productos de degradación de las RF a través de HPLC y GC-MS y medir actividad enzimática que se presentó.

Las extracciones se llevaron a cabo en los tiempos establecidos utilizando una mezcla acetonitrilo-agua 1:1 con la finalidad de extraer los posibles productos de degradación solubles tanto polares como apolares generados tras estar en contacto el hongo con la resina. El mismo procedimiento se llevó a cabo en los controles para utilizarlos como referencia. El proceso de centrifugación y filtrado se hizo con el propósito de preparar las muestras para la inyección en los equipos de HPLC y GC-MS para eliminar cualquier partícula sólida suspendida.

La evaluación de cambios visibles a través del microscopio óptico en los plásticos es un método de prueba para demostrar el proceso de biodegradación. Los efectos usados para describirla incluyen cambios en la rugosidad de la superficie, formación de hoyos o fracturas, fragmentación de la muestra, cambios de color o formación de biopelículas en la superficie (Shah y col, 2008), por lo que se utilizaron para percibir el efecto de *B. adusta* en los trozos de RF sometidos a biodegradación.

Los trozos de RF extraídos se lavaron con agua corriente para eliminar el micelio crecido sobre la superficie y secaron en estufa a 40° C durante 24 horas y luego se observaron en el microscopio óptico utilizando el lente 10X únicamente ya que el grosor de la muestra impidió hacer un acercamiento mayor. La figura 34 muestra que el contacto *B. adusta* 7308 afecta la superficie de la resina con 40 días de incubación.

Este mismo comportamiento lo reportan Gusse y colaboradores utilizando *P. chrysosporium* donde explican que la presencia de la hifa creciendo en todo el trozo de polímero fue bastante obvia pero que la degradación física fue mucho más evidente en las imperfecciones de la superficie y en bordes con cortes irregulares u hoyos donde se concentró mayor cantidad de micelio produciendo marcas similares las “cicatrices de viruela” en contraste con la superficie lisa y suave de los controles colocados en el medio sin hongo.

El objetivo de utilizar HPLC en los extractos de la cinética fue únicamente comparar los cromatogramas de los controles con respecto a los extractos obtenidos del crecimiento de *B. adusta* 7308 sobre la RF para demostrar diferencias en la composición que pueden ser interpretados como posibles productos de la biodegradación ya que se pretende identificarlos por GC-MS.

Para comprobar que la RF no aporta ninguna sustancia soluble al medio de cultivo se realizó la inyección de extractos en el equipo de HPLC tanto del medio de cultivo como el medio de cultivo en contacto con la RF en el periodo más grande evaluado y el empalme de ambos cromatogramas demuestra que al ser idénticos la RF es insoluble. Los cromatogramas de los extractos en función del tiempo (figura 37) confirman que el contacto del micelio de *B. adusta* con la RF produce sustancias que se segregan al medio y al no estar presentes en los controles, las sustancias producidas deben estar relacionadas con el proceso de biodegradación de la RF (figura 38 y 39).

De los extractos acuosos anteriores se realizó una nueva extracción con cloruro de metileno para obtener una fase orgánica que pudiera ser inyectada en el equipo GC-MS ya que se detectó la presencia de azúcares residuales procedentes del medio de cultivo. Los extractos de los controles no revelan compuestos sobresalientes en el rango evaluado (Figuras 40-42) opuestamente se tiene presencia de nuevos compuestos que varían con el tiempo (Figuras 43 y 44), sin embargo, es posible que la doble extracción no haya sido eficiente y se hayan perdido sustancias importantes para su detección.

Para la identificación de los principales compuestos separados se utilizó la biblioteca NIST con que cuenta el equipo. De los compuestos identificados (figura 45) sobresale la presencia de alcohol veratrílico y veratraldehído. El alcohol veratrílico es una sustancia producida por los HL utilizada como mediador para la LiP y lo usa para oxidar lignina en estructuras con baja permeabilidad de las paredes celulares en plantas vasculares y el veratraldehído es el producto de la transformación (Torres, 2003).

Ambas sustancias se detectaron únicamente en los extractos de *B. adusta* 7308 en presencia de la RF por lo que se puede considerar que la resina induce al hongo a activar su sistema enzimático degradador de lignina que también se ha demostrado estar involucrado en la degradación de xenobióticos y que su presencia es regulada por las condiciones del medio (Barr y col., 1992, Hammel y col., 2008).

Es posible que otros productos generados por la acción enzimática de *B. adusta* bajo las condiciones de extracción llevadas a cabo no se solubilizaron o bien que ya hayan sido absorbidas por las células para metabolizarse internamente por lo que no fueron detectados. También es posible que al tiempo de la extracción aún no se hayan producido debido a la complejidad de la estructura y hasta este punto estén en proceso de formación, además también está reportado que aparentemente, la mayor parte de la degradación de

xenobióticos ocurre al tenerse un crecimiento activo, durante la fase metabólica secundaria (Brown y col., 1989).

Una evidencia más de que los HL tienen la capacidad de actuar sobre las RF fue la determinación de las actividades enzimáticas en los extractos acuosos de los cultivos de *B. adusta* en contacto con la RF. Se determinaron las actividades de las enzimas extracelulares LiP, MnP y Lac ya que está reportada su presencia en esta especie (Ward y col., 1991), sin embargo, la actividad Lac no fue detectada.

Se ha demostrado que en presencia de  $H_2O_2$  y el alcohol veratrílico la LiP regresa fácilmente a su estado nativo protegiéndola de la inactivación y además actúa como mediador de transferencia de carga en las reacciones catalizadas. Durante el ciclo catalítico de la LiP, el alcohol veratrílico (VA) es oxidado al radical catiónico ( $VA^+$ ) el cual en presencia de sustratos apropiados es reducido de nuevo a VA y está listo para repetir el proceso (Ward y col. 2004) y ambos compuestos fueron detectados en el GC-MS.

La MnP es otra enzima extracelular la cual no se une a reductores orgánicos como otras hemoenzimas. Su actividad catalítica depende de la presencia de  $Mn^{+2}$  en el medio de reacción. En este caso, el ion  $Mn^{+2}$  actúa como un mediador de bajo peso molecular el cual es capaz de oxidar diversas moléculas orgánicas (Torres y col., 2003).

Es posible que la acción conjunta de ambas enzimas extracelulares sean las responsables de los cambios físicos observados en las RF aunque el mecanismo de acción no haya sido determinado.

Brown y col. (1989), establece que los compuestos orgánicos pueden ser biodegradables, cuando son transformables por mecanismos biológicos que pueden conducir a la mineralización completa; persistentes, cuando no sufren biodegradación en un medio ambiente particular o bajo un conjunto de condiciones

experimentales específicas; y recalcitrantes, cuando intrínsecamente son resistentes a la biodegradación. La mayoría de los compuestos naturales son biodegradables, mientras que los fabricados por el hombre o xenobióticos pueden ser biodegradables, persistentes o recalcitrantes.

Debido a que los productos químicos xenobióticos han sido fabricados y desarrollados en fechas muy recientes por el hombre, han estado presentes en el medio ambiente durante periodos de tiempo comparativamente cortos. Esto significa a su vez que las comunidades microbianas presentes en el ambiente pueden no haber desarrollado mecanismos específicos para su degradación. Sin embargo, hay mecanismos posibles que pueden conducir a la biodegradación activa como por ejemplo los sistemas enzimáticos poco específicos en relación a su unión con el sustrato por lo que es posible que las enzimas ligen sustratos análogos a los naturales que contengan grupos funcionales xenobióticos. Si éstos no alteran la distribución de cargas del centro activo, es posible que la enzima catalice su reacción particular con el xenobiótico como sustrato. El éxito del mecanismo “gratuito” como mecanismo biodegradador depende también de otros factores tales como la capacidad del xenobiótico para actuar como inductor y la naturaleza del producto que se forma (Brown y col., 1989).

La estructura polimérica entrecruzada y la consistencia sólida e impermeable de las RF son características que dificultan la biodegradación al igual que ocurre con la lignina que químicamente es un polímero heterogéneo, amorfo y altamente ramificado, por lo que ambos imponen restricciones para su biodegradación y su tamaño impide poder ser degradados intracelularmente.

Kaplan y col., (1979) confirman una velocidad de descomposición para los polímeros de RF extremadamente baja por lo que son menos susceptibles a la biodegradación (Gautam y col., 2006) sin embargo, los hongos ligninolíticos tienen la capacidad para mineralizar eficientemente la lignina ya que han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular por lo que es aplicable a polímeros. El mecanismo del sistema degradador de

lignina está basado en la producción de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La enorme diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere un uso potencial en biorremediación de sistemas contaminados con este tipo de compuestos (Dávila y col., 2006).

En este estudio, el desarrollo de micelio sobre la RF, el cambio de color en el medio de cultivo, la evaluación de cambios visibles en la textura, pérdida de peso, fragilidad, observaciones en microscopio óptico y en el MEB, detección posibles productos de degradación por HPLC y la determinación de la actividad enzimática positiva para tanto de LiP como MnP en el cultivo de *B. adusta* 7308 en contacto con la RF son indicadores positivos de que las RF pueden incorporarse como sustrato en el medio de cultivo de los HL y que son susceptibles de biodegradarse aunque el periodo de tiempo es indeterminado.

## 7. CONCLUSIONES

---

- ▶ La RF sintetizada en el laboratorio corresponde a la baquelita (demostrado mediante espectrometría de IR); es un polímero sólido termoestable con estructura entrecruzada que lo hace muy resistente y es considerado como recalcitrante.
- ▶ Los espectros de IR confirman que se presentó el proceso de polimerización ya que la estructura de la RF muestra los enlaces característicos.
- ▶ La RF no inhibe el crecimiento de los hongos ligninolíticos *B. adusta* 7308, *P. ostreatus* 7992, *P. chrysosporium* 4521 y la formación de biopelícula en su superficie, los cambios en su textura, fragilidad, pérdida de peso son indicadores iniciales de su biodegradación.
- ▶ La observación por microscopía óptica de la RF, mostró que el crecimiento de los hongos afecta la estructura de la resina, encontrándose cicatrices y fisuras en la superficie de la misma.
- ▶ Los cambios morfológicos en la superficie observada a través de MEB demuestra que estos microorganismos tienen la capacidad de biodegradar este tipo de materiales recalcitrantes, a través del sistema enzimático extracelular detectado (LiP y MnP) que es muy inespecífico y capaz de actuar sobre este tipo de estructuras.
- ▶ La cromatografía de líquidos de alta resolución demuestra la presencia compuestos que pueden ser considerados productos de biodegradación en los extractos obtenidos de las muestras en contacto con *B. adusta* y que no se presentan en los controles.





- ▶ La GC-MS evidencia la presencia de alcohol veratrílico y veratraldehído en los extractos con RF por lo que la resina induce a *B. adusta* a producir alcohol veratrílico que es un mediador de la enzima LiP.



## 8. GLOSARIO

---

- Agar** Extracto coloidal gelatinoso extraído de las algas rojas de géneros como *Gelidium*, *Gracilaria*, and *Eucheuma* usado especialmente en medio de cultivo para microorganismos o como agente gelificante y estabilizador en alimentos.
- Baquelita o bakelita** Nombre comercial de la primera sustancia plástica totalmente sintética obtenida a partir de fenol y formaldehído, nombrada así en honor a su creador, el belga Leo Baekeland.
- Biodegradación** Transformación catalizada biológicamente de un compuesto a formas más simples.
- Buffer** Mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido débil y su base conjugada que tiene la propiedad de mantener estable el pH de una disolución frente a la adición de Cantidades relativamente pequeñas de ácidos o bases fuertes.
- Catalizador** Sustancia que acelera una reacción química reduciendo la energía de activación de la reacción sin sufrir ella misma cambios permanentes durante el proceso.
- Cepas fungales** Conjunto de especies de hongos.
- Cometabolismo** Transformación microbiana de un compuesto que no sirve como fuente primaria de carbono y energía.
- Cromatografía** Técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla por medio de una fase móvil y otra estacionaria.

- Duroplásticos** Son los polímeros entrecruzados que solidifican en forma definitiva cuando se les aplica calor y presión durante el moldeo, el recalentamiento no los ablanda y si el calor continúa la pieza llega a carbonizarse directamente. También se conocen como plásticos termoestables o termofijos.
- Enzima** Catalizador de naturaleza proteica que acelera reacciones biológicas específicas.
- Esterilizar** Método de control del crecimiento microbiano que involucra la eliminación de todas las formas de vida microscópicas, incluidos virus, esporas y hongos.
- Fenol**  $C_6H_5OH$ . Cristales blancos; venenoso y corrosivo, funde a  $43^\circ C$  y hierve a  $182^\circ C$ ; es soluble en alcohol, agua, éter y otros disolventes; se emplea en la fabricación de resinas y herbicidas y como intermedio químico y disolvente.
- Formaldehído**  $HCHO$ . Es el aldehído más sencillo; es gaseoso a temperatura ambiente y en solución un líquido incoloro transparente, venenoso, de olor picante; se emplea para fabricar resinas sintéticas por reacción con fenoles, urea y melanina, como producto químico intermedio, como líquido para embalsamar y como desinfectante. Se denomina también formol.
- Hifa** Unidad individual de la forma de crecimiento filamentosa que se compone de células alargadas en los hongos.

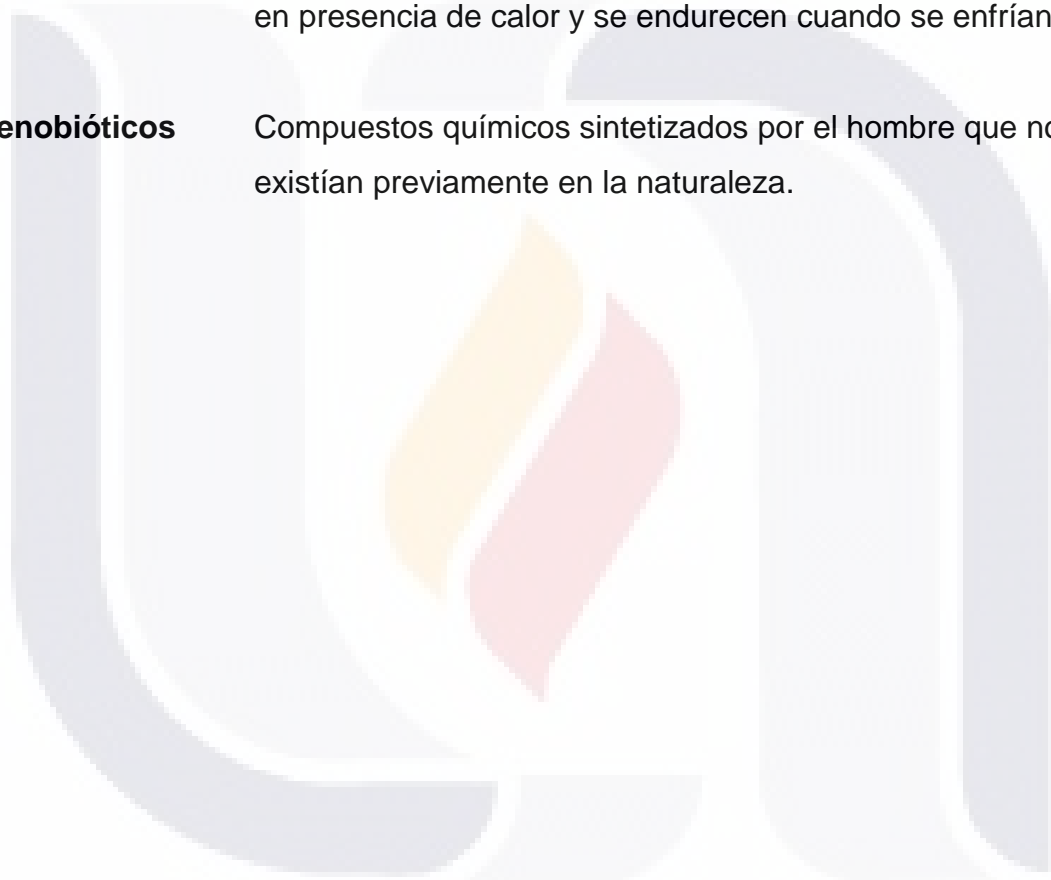
<b>Hongos ligninolíticos</b>	Hongos también denominados de la pudrición blanca de la madera, comprenden un grupo de organismos con capacidad para mineralizar eficientemente la lignina.
<b>Incubar</b>	Favorecer el crecimiento de un microorganismo en condiciones adecuadas.
<b>Inocular</b>	Introducir un organismo en un medio favorable para que se propague.
<b>Lacasa</b>	Enzima fenol oxidasa producida por los hongos ligninolíticos que reduce el oxígeno molecular a agua, y a través la utilización de ciertos compuestos redox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina.
<b>Lignina</b>	Polímero complejo insoluble en agua, formado por fenol y otros monómeros aromáticos. Se asocia con la celulosa y conforma un material que fortalece la pared celular.
<b>Lignina peroxidasa</b>	(LiP) Peroxidasa producida por los hongos ligninolíticos capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).
<b>Manganeso peroxidasa</b>	(MnP) Enzima hemoperoxidasas producida por los hongos ligninolíticos que oxida el $Mn^{2+}$ P a la especie oxidante $Mn^{3+}$ .

<b>Medio de cultivo</b>	Mezcla de sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio en la que crecen los microorganismos.
<b>Micelio</b>	Conjunto de hifas.
<b>Mineralización</b>	Transformación biológica de compuestos orgánicos a formas minerales.
<b>Novolaca</b>	Resina fenólica que se obtiene mediante la reacción de fenol y formaldehído bajo condiciones ácidas con exceso molar en fenol. La relación molar fenol-formaldehído es 1:(0.75-0.85) y el catalizador empleado es el ácido oxálico.
<b>Plástico</b>	Sustancia capaz de ser moldeada en formas variadas.
<b>Polímero</b>	Macromoléculas que se producen por la unión de cientos de miles de moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman enormes cadenas de las formas más diversas.
<b>Polímero sintético</b>	Sustancias orgánicas de alto peso molecular que se sintetizan a partir de sustancias de bajo peso molecular.
<b>Resina</b>	Sustancias naturales o sintéticas inicialmente líquidas que al polimerizarse por métodos químicos da lugar a productos sólidos de manera irreversible.
<b>Resina fenólica</b>	Polímero termoestable producto de la reacción entre el fenol y el formaldehído. Por la acción del curado solidifica de manera irreversible.

**Resol** Resina fenólica que se obtiene mediante la reacción de fenol y formaldehído bajo condiciones básicas con exceso molar en formaldehído. La relación molar fenol-formaldehído es 1:(1.2-3) y el catalizador empleado es el NaOH.

**Termoplásticos** Polímeros de cadena lineal o poco ramificada que se ablandan en presencia de calor y se endurecen cuando se enfrían.

**Xenobióticos** Compuestos químicos sintetizados por el hombre que no existían previamente en la naturaleza.



## 9. BIBLIOGRAFIA

---

Bailey P, Bailey C. (1998). Química orgánica. Conceptos y aplicaciones. Editorial Pearson Educación. 5ª. Edición. México. p 426-431.

Barr D, Shah M, Grover T, Aust S. (1992). Production of Hydroxyl Radical By Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol. 298, No. 2: 480-485.

Biblioteca Salvat de grandes temas. Tomo 77. (1975). Nuevos Productos químicos. Salvat editores. España. p 1-30.

Brown CM, Campbell I, Priest FG. (1989), Introducción a la biotecnología. Editorial Acribia. España, p 146-148.

Clesceri L.S, Greenberg RR. (1989). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17º edición. Port City Press, Baltimore, E.U.A.

Cristán, FA, Ize LI, Gavilán GA. (2003). La situación de los envases en México. *Gaceta ecológica*. INE. SEMARNAT. México. Oct.-Dic. 069: 67-82.

Deguchi T, Kakezawa M, Nishida T. (1997). Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 63, No. 1: 329-331.

Fedorak PM. (2005). Microbial processes in the degradation of fibers. *Biodegradable and sustainable fibers*. Blackburn, R.S. <http://site.ebrary.com>

García R. M., Peralta P.R. (2008). Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol 7, No. 1: 1-12.

Gardziella A, Pilato LA, Knop, A. (2000). Phenolic Resins. Ed. Springer.

- Greiner E. (2002). Phenolic resins. Chemical Economics Handbook. SRI International.
- Groover M. (1997). Fundamentos de manufactura moderna, materiales, procesos y sistemas. Prentice-Hall hispanoamericana. México.
- Gusse AC, Millar PD, Volk TJ. (2006). White-rot degradation first biodegradation of phenolic resin. *Environ. Sci. Technol.* 40: 4196-4199.
- Haemmerly S, Leisola M, Sanglard D, Fiechter A. (1986). Oxidation of Benzo( $\alpha$ )pyrene by Extracellular Ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. *The journal of biological chemistry*. Vol. 261, No. 15: 6900-6903.
- Hammel K, Cullen D. (2008). Role of fangal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*. 11: 349-355.
- Iiyoshi Y, Tsutsumi Y, Nishida T. (1998). Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. *J. Wood Sci.* 44: 222-229.
- Ikada E. (1999). Electron microscope observation of biodegradation of polymers. *J. Environ. Polym. Degr.* 7, 197-201.
- INEGI, La industria química en México 2009. Serie estadísticas sectoriales. No. 23. 2010.
- Jaszek M, Grzywnowicz E, Malarczyk E, Leonowicz A. (2006). Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 147-154.



- Jennings D.H. (1999). Fangal biology: understanding the fangal lifestyle. *Bios Scientific Publishers*. Springer. p 51.
- Kaplan D.L., Hartenstein R., Sutter J. 1979. Biodegradation of polystyrene, poly(methyl methacrylate), and phenol formaldehyde. *Appl. Environ. Microbiol.* 38,3: 551-553.
- Levin M, Gealt MA. (1997). Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Mc Graw Hill Inc. México. p 1-15.
- Martín MC, González BA, Blanco SM. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev. Iberoam. Micol.* 21: 103-120.
- Montalvo SL. (2007). Plásticos industriales y su procesamiento. Monografías. Argentina. p 8-42.
- Poljansek I, Matjaz K. (2005). Characterization of phenol-formaldehyde prepolymer resins by in line FT-IR spectroscopy. *Acta Chim. Slov.* 52, 238-244.
- Romero E, Speranza M, García-Guinea J, Martínez AT, Martínez MJ. (2007). An anamorph of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* capable of colonizing and degrading compact disc components. *Blackwell Publishing Ltd.* 275: 122-129.
- Saechtling H. (1995). International plastics handbook for the technologist, engineer and user. 3a. edición. Hanser Publishers. p 333-335.
- Scheirs J. (2000). Compositional and Failure Analysis of Polymers. A practical approach. John Wiley & Sons. E.U.A. p 173-174.
- SENER. (2008). Anuario estadístico de la industria petroquímica 2007. México.

- Seneviratne G, Tennakoon NS, Weerasekara M, Nandasena K. (2006). Polyethylene biodegradation by a developed *Penicillium-Bacillus* biofilm. *Current Science*. 90, No.1: 20-21.
- Seymour R, Carrenher C. (1995). Introducción a la química de los polímeros. Editorial Reverté. España. p 270-271.
- Shah A, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. No. 26. p 246-265.
- Shimao M. (2001). Biodegradation of plastics. *Curr. OpinBiotechnol*. 12: 242-247.
- Sodhi GS. (2000). Fundamental concepts of environmental chemistry. Alfa Science. India. p161.
- Solís S. (2005). Hongos que eliminan contaminantes. Revista I Kanik. CONCYTEY.
- Stamets P. (2004). Healing the planet with mushrooms.e-magazine *Bio Inspire*. 24 2.24.05. <http://bioinspired.sinet.ca/content/february-2005-earths-natural-internet-healing-planet-mushrooms>.
- Sundarapandiyam S, Ramanaiah B, Chandrasekar R, Saravanan P. (2010). Degradation of Phenolic Resin by *Trametes versicolor*. *J. Polym Environ*. 18: 674-678.
- Tien M, Kirk K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol*. 161:238-248.
- Torres E, Bustos JI, Le Borgne S. (2003). Potencial use of oxidative enzymes for detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* No. 46 : 1-15.

- Vidali M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, Vol 73, No. 7: 1163-1172.
- Vigilante A. (2005). Polímeros. Ilustrados.com. Ebrary.com. Perú. p 2-27.
- Wainwright M. (1995). Introducción a la biotecnología de los hongos. Editorial Acribia. España.
- Wakeman R. (1947). The chemistry of commercial plastics. Reinhold Publishing Co. E.U.A. p 115-121.
- Ward G, Hadar Y, Dosoretz C. (2004). The biodegradation of lignocellulose by White Rot Fungi in Mycology Vol. 21 *Fungal Biogechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications*. Dilip K. Arora. p 393-406.
- Ward O.P. (1991). Biotecnología de la fermentación. Principios, procesos y productos. Editorial Acribia. España. p 65.
- Wariishi H, Valli K, Gold M. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267: 23688 -23695.
- Weininger, S, Stermitz F. (1988). Química orgánica. Editorial Reverté. España.
- Zheng Y, Yanful EK. (2005). A Review of plastic waste biodegradation. *Critical Review in Biotechnology.* 25: 243-250.

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

---

### Medio agar dextrosa papa (PDA) Bioxon

Uso: Para cultivo e identificación de hongos y recuento de levaduras.

Contenido:

Infusión de papa (sólidos)	4 gr.
Dextrosa	20 gr.
Agar	15 gr.
pH final $5.6 \pm 0.2$	

Mezclar 39 gr. del polvo en un litro de agua. Calentar con agitación y poner a hervir durante 1 minuto hasta lograr la disolución completa. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos y distribuir en cajas Petri estériles.

### Medio agar malta

Uso: Para aislar y cultivar levaduras y hongos.

Contenido:

30 gr. de extracto de malta BBL
15 gr. de agar BIOXON

Mezclar ambos componentes en buffer de fosfatos 100 mM pH 5 y aforar a 1 litro. Calentar con agitación y poner a hervir durante 1 minuto hasta lograr la disolución completa. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos y distribuir en cajas petri estériles.

### Medio glucosa levadura malta (GYM)

Contenido:

10 gr. de glucosa
2 gr. de extracto de levadura
3.5 gr. de extracto de malta
0.5 gr. de extracto de magnesio $7\text{H}_2\text{O}$
0.1 gr. de pectona
0.1 ml solución de sales*

Mezclar todos los componentes en agua destilada para obtener un litro de medio.

\*Solución de sales

Para preparar un litro de solución mezclar con agua destilada

5.0 mg. de sulfato cúprico

1.6 mg. de sulfato de manganeso (+2)

1.4 mg. de sulfato de zinc

2.9 mg. de cloruro de cobalto

**Buffer de fosfatos 100 mM pH 5**

Para 1 litro

Fosfato dibásico de potasio	$K_2HPO_4$	0.106 gr.
-----------------------------	------------	-----------

Fosfato monobásico de potasio	$KH_2PO_4$	13.525 gr.
-------------------------------	------------	------------

Ajustar pH a 5

**Solución de 4-aminoantipirina 2 % (P/V)**

2 gr. de 4-aminoantipirina y disolver en 100 ml de agua. Se prepara diariamente.

**Solución de Ferricianuro de potasio 8% (P/V)**

8 gr. de ferricianuro de potasio  $[K_3Fe(CN)_6]$  en 100 ml de agua, filtrar si se requiere y almacenar en frasco ámbar. Se prepara cada semana.

**Solución de amoníaco 0.5 N**

Diluir 35 ml de  $NH_4OH$  y aforar a un litro con agua.

**Buffer de acetatos pH5 100 mM**

pK= 4.76 densidad ácido acético= 1.05 gr/ml P.M. ácido acético 60 gr/mol  
pureza100% P.M. acetato de sodio 82 gr/mol

Para 1 L disolver en 950 ml de agua

Acido acético glacial 2.1 ml Acetato de sódio 5.2 gr.

Ajustar pH y aforar a 1 litro.

**Syringaldazina 0.8 mM en metanol**

P.M. 360.37

Para 100 ml pesar 0.0288 gr y disolver en metanol. Aforar a 100 ml

#### **Buffer de succinatos 40 mM pH 4**

Ac. Succinico P.M. 118.1

Para 200 ml pesar 0.9448 gr y disolver en agua desionizada, ajustar pH y aforar a 200 ml.

#### **Alcohol veratrílico (3,4 dimetoxibencil alcohol) 40 mM**

P.M. 168.19

Densidad 1.173 gr/ml

Pureza 96%

Para 50 ml diluir 300  $\mu$ l en metanol y aforar a 50 ml.

#### **Agua oxigenada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para LiP (concentración final 0.4 mM)**

Preparar a una concentración de 0.03% diariamente.

Para 1 ml:

Preparar 1 ml de peroxido de hidrógeno al 0.3% mezclando 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % con 900  $\mu$ l de agua desionizada. Luego tomar 100  $\mu$ l de la mezcla anterior y agregarle 900  $\mu$ l de agua

#### **Buffer de malonatos 50 mM pH 4.5 con sulfato manganoso 1 mM MgSO<sub>4</sub>**

Acido malónico P.M. 104.06

Pureza 99%

Para 100 ml pesar 0.52556 gr, ajustar pH a 4.5 y aforar.

Sulfato manganoso 4 H<sub>2</sub>O P.M. 223.06

Para 100 ml pesar 0.0329 gr de MgSO<sub>4</sub> 4 H<sub>2</sub>O y mezclarlo con el buffer de malonatos.

#### **Agua oxigenada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para MnP (concentración final 0.1 mM)**

Preparar a una concentración de 0.01% diariamente.

Para 1 ml:

Preparar 1 ml al 1% mezclando 33  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 967  $\mu$ l de agua desionizada. Tomar 10  $\mu$ l de la mezcla anterior y agregarle 900  $\mu$ l de agua.

REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Ciudad Universitaria, 02 de febrero 2012.

Dr. Juan Jáuregui Rincón  
Departamento de Ingeniería Bioquímica,  
Centro de Ciencias Básicas,  
Universidad Autónoma de Aguascalientes,  
México,  
Presente.

Estimado Dr. Juan Jáuregui Rincón

Por medio de la presente tengo el agrado de comunicarle que su trabajo **EVIDENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN DE RESINAS FENÓLICAS CON HONGOS LIGNINOLÍTICOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**, bajo la autoría de Graciela Ibeth Ponce Andrade, Juan Jáuregui Rincón, Rafael Vázquez Duhalt, Refugio Rodríguez Vázquez, Iliana Ernestina Medina Ramírez, Juan Antonio Lozano Álvarez, fue aceptado para su publicación en el Número 2, Volumen 28, correspondiente al año 2012 de la Revista Internacional de Contaminación Ambiental.

Atentamente

Dr. Rafael Villalobos Pietrini  
Editor



<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rca/index>

Rev. Int. Contam. Ambio. 28 (2) 159-166, 2012

**EVIDENCIA DE LA BIODEGRADACIÓN DE RESINAS FENÓLICAS CON HONGOS LIGNINOLÍTICOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Graciela Ibeth PONCE ANDRADE<sup>1</sup>, Rafael VÁZQUEZ DUHALT<sup>2</sup>,  
Refugio RODRÍGUEZ VÁZQUEZ<sup>3</sup>, Iliana Ernestina MEDINA RAMÍREZ<sup>1</sup>,  
Juan Antonio LOZANO ÁLVAREZ<sup>1</sup> y Juan JAUREGUI RINCÓN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Aguascalientes

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>3</sup> Departamento de Biotecnología, CINVESTAV, IPN

\*Autor responsable; jjaureg@correo.uaa.mx

(Recibido agosto 2011, aceptado febrero 2012)

Palabras clave: resina fenólica, biodegradación, white-rot fungi, *Bjerkandera adusta*

**RESUMEN**

Los polímeros sintéticos están generando problemas ambientales debido a que generalmente son resistentes a la degradación, sin embargo, investigaciones recientes se han enfocado en métodos biológicos para tratar estos residuos y el desarrollo de plásticos degradables. Los plásticos están clasificados en dos grandes tipos: termoplásticos y termoestables. Las resinas fenólicas están incluidas dentro de los termoestables, las cuales no pueden ser fundidas por lo tanto no son susceptibles al reciclado y causan un problema ambiental. A través de los estudios acerca de los hongos ligninolíticos se ha determinado que estos organismos producen enzimas extracelulares con alta inespecificidad química e intensa actividad oxidante, lo que les otorga una considerable capacidad para degradar diferentes compuestos orgánicos con estructura similar a la lignina. El objetivo de este trabajo fue demostrar, utilizando microscopía electrónica de barrido que los hongos ligninolíticos tienen la capacidad de degradar las resinas fenólicas. Los resultados demostraron que los hongos *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Sporotrichum pulverulentum* pueden degradar las resinas fenólicas.

Key words: Phenolic resins, biodegradation, White-rot fungi, *Bjerkandera adusta*

**ABSTRACT**

Synthetic polymers are growing environmental concern because they are generally non-degradable and recent research has been focused on the biological treatment of plastic wastes and the development of biodegradable plastics. Plastics are classified into two broad types: thermoplastics and thermosetting plastics. Phenol-formaldehyde resins (PF resins) are included in the thermosetting plastic category. They are products that once formed cannot be soften, therefore the process for recycling cannot be applied and they cause an environmental problem. Through intensive study of white-rot fungi it has been determined that these organisms produce extracellular enzymes with very low substrate specificity and intense oxidative activity. This makes them suitable for degradation of many different compounds notably organopollutants with structural similarities to lig-



nin. The object of this work was to demonstrate, using scanning electron microscopy, that ligninolytic fungi have the capacity to degrade PF resins. The results showed that the fungi *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Sporotrichum pulverulentum* can degrade the PF resins.

## INTRODUCCIÓN

Los tiempos modernos se han caracterizado por la gran producción de materiales sintéticos que son difíciles de degradar y son tóxicos para el ambiente. Con el fin de mejorar su rendimiento, los compuestos han sido diseñados específicamente para tener una larga vida útil y no reaccionar con los productos químicos comunes (Levin y Gealt 1997). Ellos son extremadamente estables y no fácilmente entran a los ciclos de degradación de la biosfera. La contaminación ambiental por desechos de polímeros sintéticos ha sido reconocida como un problema grave. Con el fin de apoyar el desarrollo sustentable en el mundo, este problema debe ser atendido (Ikada 1999, Shimao 2001) de aquí surge la necesidad de estudiar la degradación de polímeros ya que ahora se necesita reducir la cantidad de desechos que se generan por el uso de los materiales poliméricos y su poca compatibilidad con el ambiente (Cristán *et al.* 2003).

Dentro de la gran variedad de polímeros sintéticos existente, a todos ellos se les puede clasificar en dos grandes grupos con base a su comportamiento ante el calor: los termoplásticos o termodeformables y los duroplásticos o termoestables (Sodhi 2000). Los termoplásticos son los que experimentan cambios reversibles ya que se ablandan en presencia del calor y se endurecen cuando se enfrían por lo que son susceptibles de ser reciclados; por otro lado, los duroplásticos son aquellos que se solidifican en forma definitiva cuando se les aplica calor y presión durante el moldeado, el recalentamiento no ablanda estos materiales y si la aplicación de calor continúa la pieza llega a carbonizarse directamente (Montalvo 2007). Las resinas consisten inicialmente de moléculas lineales pero por calentamiento forman irreversiblemente una red de enlaces entrecruzados, produciendo una estructura reticular tridimensional que no se funde, proporcionando un producto final generalmente más duro, fuerte y resistente al calor que un termoplástico (Cristán *et al.* 2003) y que después de enfriarse no pueden recuperarse para transformaciones posteriores, por lo cual no son susceptibles para el reciclado.

A este grupo pertenecen las resinas fenólicas (RF) las cuales se forman por policondensación del fenol y del formaldehído. Están conformadas por anillos aro-

máticos, unidos por el grupo metileno. Las uniones del producto ocurren principalmente en la posición *orto* ó *para* con los hidroxilos fenólicos. Poseen una amplia variedad de aplicaciones. Su mercado más importante se centra en polvos de moldeo, materiales de aislamiento térmico y adhesivos en la fabricación de tableros aglomerados y contrachapados. Esto supone un consumo del 75 % del total de las resinas fenólicas producidas. El resto se destina exclusivamente a la fabricación de adhesivos para la industria de tableros (Gardziella *et al.* 2000).

La descomposición de los desechos de RF únicamente es posible realizando la incineración del material, ya que es muy resistente a la temperatura, pH extremos, alta humedad, radiación, corrosión y tiene excelentes propiedades aislantes. Desafortunadamente el proceso de incineración también contamina por lo que una alternativa es la biodegradación, que consiste en la capacidad de los microorganismos de convertir los compuestos complejos a sustancias elementales y los contaminantes a compuestos no tóxicos, sin embargo hasta hace poco más de cuatro años no se tenía evidencia de su biodegradabilidad (Gusse *et al.* 2006). Debido a la importancia de estos plásticos en el mercado y la acumulación de sus desechos es imperativo encontrar sistemas biológicos capaces de reciclar al ambiente estos compuestos contaminantes.

Los hongos ligninolíticos (HL), también llamados hongos de la pudrición blanca de la madera tienen la capacidad de degradar la lignina. La peculiar irregularidad estructural del polímero de lignina hace que estas enzimas se caractericen por tener mecanismos de acción poco específicos que oxidan los anillos aromáticos constitutivos de dicho polímero. Las enzimas que participan en este proceso son la lignina peroxidasa, la peroxidasa dependiente de manganeso y la lacasa, una fenoloxidasas que contiene principalmente cobre en su sitio activo. El patrón de expresión de esas actividades enzimáticas depende de los diferentes organismos y del medio en donde se desarrollen.

La inespecificidad química y la intensa actividad oxidante de estas enzimas les confieren una considerable capacidad de degradar diferentes compuestos orgánicos con estructura similar a la de las unidades monoméricas que constituyen la lignina. Entre los

diferentes xenobióticos que pueden ser transformados por hongos basidiomicetos se encuentran fundamentalmente plaguicidas, hidrocarburos aromáticos (benzo(a)pireno, fenantreno, pireno, etc.) compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados) azocolorantes, etc. Este sistema ligninolítico, ha demostrado ser muy versátil y atractivo para fines ambientales, porque puede servir para eliminar diversos contaminantes difíciles de degradar (Solís 2005).

Existen escasos reportes referentes a la biodegradación de la RF empleando microorganismos (bacterias y hongos). Kaplan *et al.* (1979) ensayaron 17 especies de hongos. La biodegradación de las RF fue muy escasa obteniendo porcentajes de 0 a 0.17 % en un periodo de 35 días. También ensayaron consorcios microbianos y los porcentajes de biodegradación fueron similares a pesar de que los tiempos de degradación se llevaron hasta 11 semanas, por lo que ellos concluyeron que estas resinas son recalcitrantes. Gusse *et al.* (2006) fueron los primeros en reportar la biodegradación de estas resinas por medio de HL que estaban consideradas como no biodegradables. El organismo que ha sido reportado como degradador de estas resinas fenólicas es *Phanerochaete chrysosporium*. Sundarapandiyar *et al.* (2010) reportaron a *Trametes versicolor* como un hongo capaz de biodegradar las RF, pero ellos utilizaron un producto comercial llamado Basyntan D1 que es un condensado de fenol y naftol, el cual es soluble en agua y en este trabajo lograron reducir la demanda química de oxígeno, la demanda bioquímica de oxígeno y el carbono orgánico total en 76.66, 65.11 y 72.94 % respectivamente en un periodo de ocho días.

El objetivo de este trabajo fue demostrar utilizando microscopía electrónica de barrido que los HL tienen la capacidad de degradar las resinas fenólicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I Cepas fúngicas

Se trabajó con las siguientes cepas de HL: *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992, *Phanerochaete chrysosporium* 4521, *Sporotrichum pulverulentum* 4521, *Trametes versicolor* 8272, *Ganoderma applanatum* 8168, *Trametes hirsuta* 8165, obtenidas de la Universidad de Alberta, del Mold Herbarium (Edmonton, Canadá). Todos los hongos fueron mantenidos en cajas Petri con PDA de 4-7 °C y resembrados cada 60 días.

### II Síntesis de la resina

Para la síntesis de la RF se usó la formulación reportada por Saechtling (1995), la cual es representativa de los productos comerciales pero sin aditivos. Se hizo reaccionar formaldehído y fenol en proporción 1.25:1 respectivamente en medio alcalino con agitación constante en baño de agua a 70 °C por una hora. Se curó la resina a 100 °C por 24 horas; se enfrió y se fragmentó en trozos pequeños y se lavó varias veces con agua destilada hasta eliminar residuos de los reactivos. Los trozos obtenidos se secaron a 110 °C por 24 horas. Se registró el peso de cada uno de ellos y se esterilizaron por 20 minutos a 121 °C con calor húmedo.

### III Ensayo de biodegradación

La biodegradación se realizó en cajas Petri con agar-malta al 3 %. En cada caja se colocó un trozo de RF previamente pesado y esterilizado y se inoculó con 1 cm<sup>2</sup> de micelio crecido en PDA de cada una de las cepas. El experimento se realizó por triplicado y todas las cajas se incubaron a 28 °C durante 200 días, haciendo observaciones cada 30 días. Como testigos se usaron cultivos de cada una de las cepas fúngicas sin resina y además la RF en PDA sin hongo. Al final del periodo se recuperó cada uno de los trozos de RF, se lavaron y se secaron a 110 °C durante 24 horas.

### IV Pérdida de peso

Las muestras de RF se sometieron a un lavado con ácido clorhídrico 6 N por 12 horas con el objetivo de remover el micelio del hongo que creció dentro de la RF, posteriormente se determinó el peso seco para calcular el porcentaje de pérdida de peso. Se incluyó un testigo (RF sin exponer al proceso de biodegradación y lavada con ácido).

### V Microscopía electrónica de barrido

Se realizó la observación de los trozos de RF (como testigo se usó RF sin exponer al proceso de biodegradación) en el microscopio electrónico de barrido (MEB), empleando un microscopio modelo JEOL JSM-5900 LV. En todos los casos se emplearon los mismos aumentos (20-310).

## RESULTADOS

El ensayo de biodegradación se realizó durante 200 días durante los cuales se observó la tendencia al crecimiento del micelio sobre la resina y cambios de color en el medio de cultivo en la zona circundante a

la RF y se compararon con los testigos. Después de 10 días de incubación, las cepas *Hyphokandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992, *Phanerochaete chrysosporium* 4521, *Sporotrichum pulverulentum* 4521 y *Trametes versicolor* 8272, cubrieron toda la superficie de la RF y la caja. Se evaluó la velocidad de crecimiento midiendo el diámetro del halo de crecimiento del hongo tanto en las cajas con y sin RF, sin embargo las cajas que contenían la resina presentaron cambios en la coloración del medio de cultivo como se observa en la figura 1, por lo que fueron seleccionadas para continuar con el experimento. En cambio en *Ganoderma applanatum* 8168, *Trametes hirsuta* 8260, *Trametes zonatus* 8158 y *Trametes hirsuta* 8165 el crecimiento del micelio se detuvo en los bordes de la RF. El trozo de RF testigo que estuvo en contacto con el medio de cultivo sin hongo no produjo coloración ni sufrió cambios (Fig. 2).

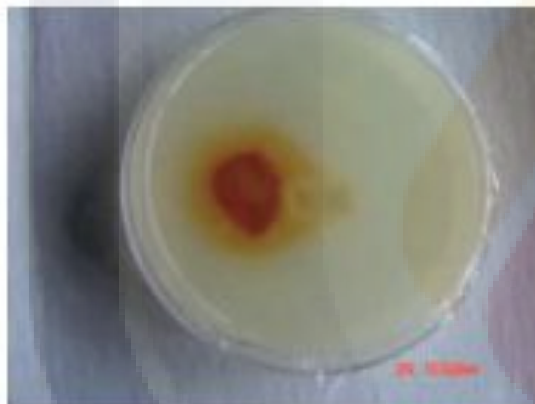


Fig. 1. *Phanerochaete chrysosporium* 4521 en RF

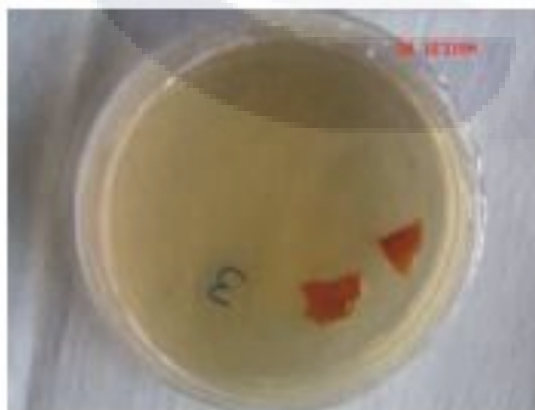


Fig. 2. Testigo: medio agar tratado al 3% con RF

Después de transcurrir el tiempo establecido para el proceso de biodegradación de RF con HL, los fragmentos se sacaron del medio de cultivo y se les realizó un lavado donde se observaron cambios evidentes en su textura (Fig. 3) y en las propiedades mecánicas del material ocasionado por el contacto con el micelio ya que al agitar algunos trozos vigorosamente se fragmentaron por completo (Fig. 4).



Fig. 3. RF tratada con *Pleurotus ostreatus* 7992



Fig. 4. RF tratada con *Phanerochaete chrysosporium* 4521 después del lavado y secado

Posteriormente las muestras seleccionadas fueron observadas con el MEB y se compararon con el testigo que presentó una superficie lisa y compacta (Fig. 5). La figura 6 muestra la acción de *H. adusta* 7308 sobre la RF donde se identifican zonas de degradación evidentes, con regiones moteadas, reducción gradual del espesor, invasión del micelio sobre la superficie y algunas fracturas. Las figuras 7 y 8 revelan como *P. ostreatus* 7992 también afectó la estructura de la RF modificando

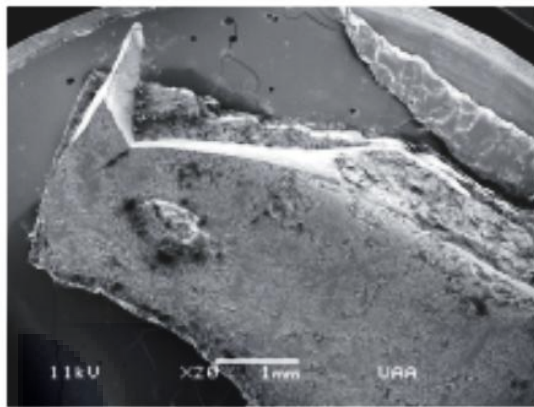


Fig. 5. Micrografía (MEB) de RF control

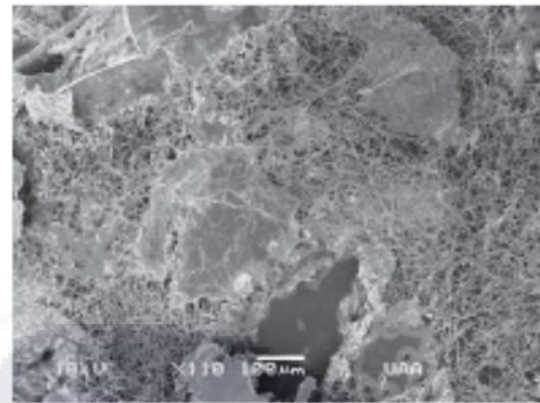


Fig. 8. Micrografía (MEB) de la RF tratada con *Pleurotus ostreatus* 7992

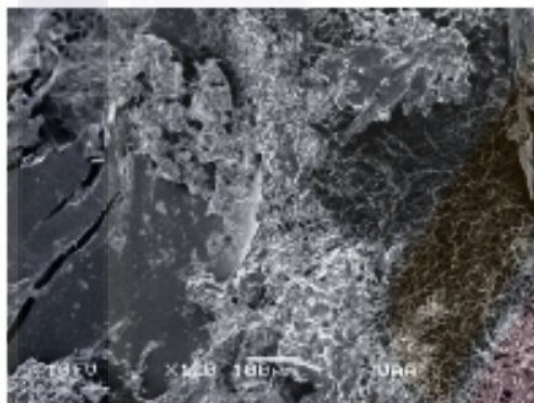


Fig. 6. Micrografía (MEB) de la RF tratada con *Bjerkandera adusta* 7308

la superficie lisa de la RF, invasión del micelio y formación de fracturas.

Las figuras 9 y 10 presentan la superficie de la RF tratada con *P. chrysosporium* 4521. Estas micrografías claramente muestran un residuo claro en la superficie, penetración del micelio en la resina y formación de poros en la superficie que demuestran el proceso de biodegradación. *Trametes versicolor* 8272 formó surcos en la superficie de la resina, invasión del micelio y zonas de degradación evidentes como se muestra en la figura 11.

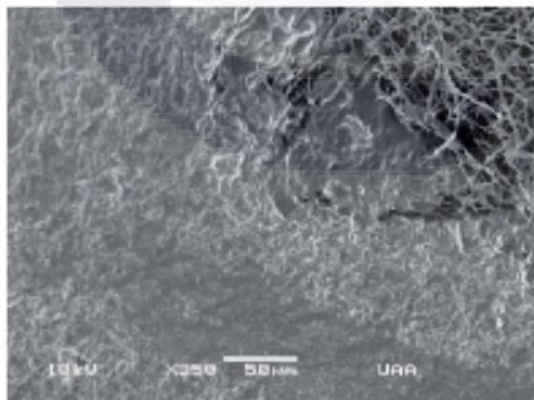


Fig. 7. Micrografía (MEB) de la RF tratada con *Pleurotus ostreatus* 7992

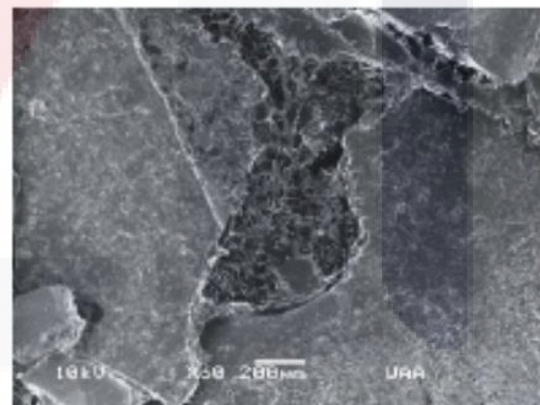


Fig. 9. Micrografía (MEB) de la RF tratada con *Phanerochaete chrysosporium* 4521

La figura 12 muestra la superficie de la RF tratada con *Sporotrichum pulverulentum* 4521 bastante afectada por la acción del hongo donde se puede apreciar la formación de poros y la fractura del material ocasionada por la biodegradación.

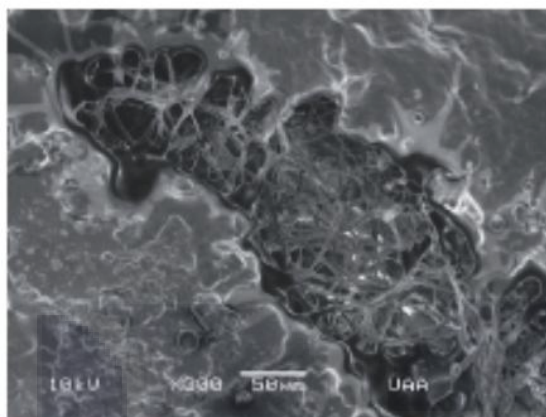


Fig. 10. Micrografía (MEB) de la RF tratada con *Phanerochaete chrysosporium* 451

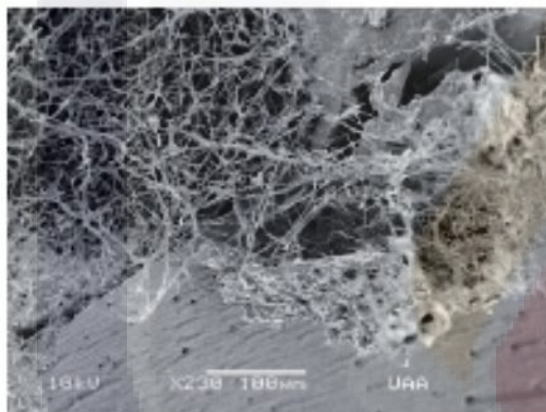


Fig. 11. Micrografía (MEB) de la RF tratada con *Trametes versicolor* 8272

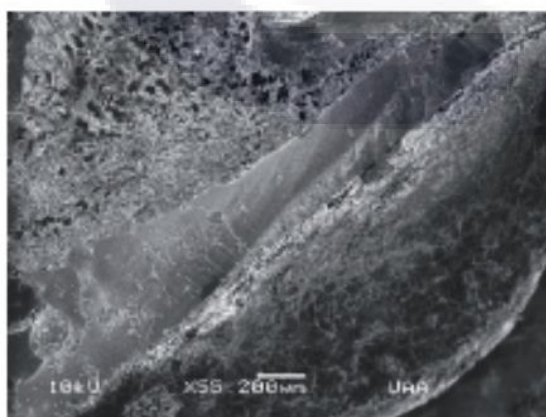


Fig. 12. Micrografía (MEB) de la RF tratada con *Sporotrichum pulverulentum* 4521

El cuadro I presenta el porcentaje promedio de pérdida de peso donde se puede apreciar que después del tiempo transcurrido el material de RF sometido a biodegradación por medio de los HL sufre una disminución en todos los casos.

CUADRO I. PORCENTAJE DE PÉRDIDA DE PESO

Cepa fungica	% de cambio $\pm$ D. E.
Testigo (medio con RF)	0.0 $\pm$ 0.0
<i>Bjerkandera adusta</i> 7308	4.3 $\pm$ 0.2
<i>Pleurotus ostreatus</i> 7992	5.1 $\pm$ 0.3
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 4521	6.3 $\pm$ 0.2
<i>Sporotrichum pulverulentum</i> 4521	1.8 $\pm$ 0.1
<i>Trametes versicolor</i> 8272	2.1 $\pm$ 0.3

## DISCUSIÓN

Entre los polimeros sintéticos más antiguos y aún extremadamente importantes se encuentran las RF que son insolubles y no pueden ser fundidas. Estas propiedades han generado gran demanda por estos polimeros tan resistentes pero también los hacen extremadamente difíciles de degradar (Gusse *et al.* 2006). Cuando termina su vida útil se convierten en un desecho que se acumula porque no se puede reciclar y contamina el ambiente. Debido a la importancia comercial y al problema ambiental que generan estos compuestos surge la necesidad de buscar alternativas para su degradación.

Debido a que un indicador inicial de la biodegradación de un material es el cambio en su apariencia y la microscopía se usa frecuentemente para observar la colonización microbiana y los cambios físicos en los materiales (Fedorak 2005), se desarrolló un ensayo para demostrar la capacidad de los HL de degradar RF usando microscopía electrónica de barrido y se encontró que el crecimiento de las cepas *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992, *Phanerochaete chrysosporium* 4521, *Sporotrichum pulverulentum* 4521 y *Trametes versicolor* 8272 en medio agar-malta con trozos de RF dio resultados positivos.

Como testigo se colocaron trozos de resina en el medio de cultivo únicamente y se incubaron en las mismas condiciones que las muestras sometidas a biodegradación observándose que la RF no generó cambios en la coloración del medio de cultivo (Fig. 2). En cambio, en las cajas que contenían RF y las cepas de *Bjerkandera adusta* 7308, *Pleurotus ostreatus* 7992, *Phanerochaete chrysosporium* 4521, *Sporotrichum pulverulentum* 4521 y *Trametes versicolor* 8272 hubo crecimiento uniforme de micelio sobre la

superficie de la resina y se presentó una coloración en el medio de cultivo por debajo de la región donde se colocó el trozo de RF (Fig. 1). Un segundo control fue el cultivo de las cepas en el mismo medio de cultivo pero sin RF y no hubo cambio de coloración lo que implica que los hongos ligninolíticos están relacionados con la transformación de este material. Estas cepas fueron seleccionadas para ser observadas en el MEB.

Al realizar la separación de las RF sometidas a biodegradación se observó un cambio en su apariencia física, especialmente en cuanto a la rugosidad y fragilidad del material ya que al ser sometido a agitación vigorosa algunos de los trozos se fragmentaron totalmente (Fig. 4), lo que puede ser considerado como un indicador del ataque fungal, aunque esto no demuestre que se trata de un proceso de degradación en términos del metabolismo (Shah *et al.* 2008).

A través del microscopio electrónico de barrido fue posible observar que las hifas producen zonas moteadas, surcos y zonas de evidente degradación en la superficie de la RF que gradualmente van reduciendo su espesor, formando poros o bien ocasionan que los fragmentos colapsen y presenten fracturas (Figs. 6-12). El crecimiento y la permanencia del micelio sobre la superficie y la penetración en cualquier irregularidad encontrada o generada en la RF permite considerar que las hifas juegan un papel importante en el proceso. En cambio, en la muestra testigo se observa una superficie lisa, tersa y compacta. (Fig. 5) Este mismo comportamiento se reporta como mecanismo de degradación de la lignina (Jennings *et al.* 1999) por lo que debido a las similitudes en la composición de ambos polímeros puede presentarse un proceso de degradación semejante.

Gusse *et al.* (2006) reportaron la primera evidencia de biodegradación de RF con hongos de la podredumbre blanca presentando una micrografía de MEB después de 28 días de incubación con *Phanerochaete chrysosporium* donde se aprecia la degradación del material (principalmente debido al número de aumentos). Sin embargo, no es tan clara como las imágenes que se presentan en este trabajo donde se muestra tanto el crecimiento del micelio como el daño que éste le causa a la RF.

Debido a la insolubilidad y el tamaño de este tipo de polímeros, los microorganismos son incapaces de transportar el material directamente al interior de sus células donde la mayoría de los procesos bioquímicos tienen lugar, por lo que primero excretan enzimas extracelulares las cuales rompen los polímeros fuera de las células. Estas enzimas son demasiado grandes

para penetrar profundamente en el polímero, por lo que actúan sólo en la superficie; por consiguiente la biodegradación de estos materiales es usualmente un proceso superficial (Muller 2003) como se observa en las figuras 6-12.

La biodegradación superficial puede ser explicada por la acción de las enzimas ligninolíticas que poseen los hongos de la podredumbre blanca que tienen la capacidad de catalizar la degradación de contaminantes usando un mecanismo de radicales libres inespecífico. Cuando un electrón es agregado o removido de su estado fundamental se vuelve muy reactivo permitiéndole dar o tomar electrones de otros compuestos. Esto provee la base de la inespecificidad de las enzimas y la capacidad de degradar xenobióticos (Hamman 2004).

Sundarapandiyan *et al.* (2010) encontraron que *Trametes versicolor* logra degradar una resina fenólica (condensado lineal) soluble en agua, el hongo produjo principalmente dos enzimas la lacasa y una polifenol oxidasa, que son las responsables de la biodegradación de ese polímero. Aunque la estructura de este compuesto es similar a la RF utilizada en este trabajo, el grado de entrecruzamiento es menor al observado en el polímero (RF) obtenido en nuestro laboratorio, lo anterior sugiere que los hongos de la pudrición blanca de la madera son capaces de biodegradar estos compuestos.

En la **cuadro I** se presenta el porcentaje de pérdida de peso de las RF. Según los resultados obtenidos *Phanerochaete chrysosporium* es el hongo que presentó la mayor pérdida de peso. Esta información confirma que la presencia del micelio sobre la RF y su metabolismo colaboran en su biotransformación. Kaplan *et al.* (1979) reportaron que la velocidad de descomposición de la lignina en suelo es de 2 a 15 % durante un mes y en cultivos axénicos con hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca de hasta el 7 %; por lo que la pérdida de peso de estos polímeros sintéticos es más lenta pero no despreciable.

## CONCLUSIONES

Las RF son polímeros que presentan entrecruzamiento de sus unidades poliméricas lo que las hace muy resistentes y estables, sin embargo la acción de los hongos ligninolíticos sobre la superficie observada a través de MEB demuestra que estos microorganismos tienen la capacidad de biodegradar este tipo de materiales recalcitrantes debido a que poseen un sistema enzimático extracelular muy inespecífico capaz de actuar sobre este tipo de estructuras.

Se han identificado otras cepas de HL que pueden biodegradar a las RF además de los hongos ya reportados: *Phanerochaete chrysosporium* (Gusse et al. 2006), *Trametes versicolor* (Sundarapandiyam et al. 2010).

La comprensión del proceso contribuirá al desarrollo de algún proceso biotecnológico para el tratamiento de polímeros de desecho como las resinas fenólicas.

### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACyT por la beca brindada (204771) al estudiante y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el financiamiento para la realización del proyecto PIBT08-8.

### REFERENCIAS

- Cristán F.A., Ize L. I. y Gavilán G. A. (2003). La situación de los envases en México. Gaceta ecológica. INE. SEMARNAT. México. Oct.-Dic. 069: 67-82.
- Fedorak P. M. (2005). Microbial processes in the degradation of fibers. En: *Biodegradable and sustainable fibres*. (Blackburn R. S. Ed.). Woodhead Publishing. Cambridge, GBR. pp. 1-30.
- Gardziella A., Pilato L.A. y Knop A. (2000). *Phenolic Resins*. Springer. Berlin 560 p.
- Gautam R., Bassi A.S. y Yauful E.K. (2007). A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 141, 85-108.
- Gusse A.C., Millar P.D. y Volk T.J. (2006). White-rot demonstrate first biodegradation of phenolic resin. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4196-4199.
- Hamman S. (2004). Bioremediation capabilities of white rot fungi. B1570-review article. [en línea]: [http://es.scribd.com/doc/35575106/Bio-Remediation-Capabilities-of-White-Rot-Fungi](http://http://es.scribd.com/doc/35575106/Bio-Remediation-Capabilities-of-White-Rot-Fungi).
- Ikada E. (1999). Electron microscope observation of biodegradation of polymers. *J. Environ. Polym. Degr.* 7, 197-201.
- Jennings D.H. y Lysek G. (1999). *Fungal Biology: Understanding the fungal lifestyle*. 2a. ed. Bios Scientific Publishers Ltd. Nueva York, 166 p.
- Kaplan D.L., Hartenstein R. y Sutter J. (1979). Biodegradation of polystyrene, poly(methyl methacrylate), and phenol formaldehyde. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 551-553.
- Levin M. y Gealt M.A. (1997). *Bioremediación de residuos tóxicos y peligrosos*. Mc Graw Hill. México, 352 p.
- Montalvo L.A. (2007). Plásticos industriales y su procesamiento. *Monografías*. Argentina. pp 8-42.
- Müller R. (2003). Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing. En: *Biopolymers, general aspects and special applications, biology, chemistry biotechnology, applications*. (A. Steinbüchel. Ed.) Weinheim: Wiley-VCH. 10, 365-388.
- Saechtling H. (1995) *Saechtling international plastics handbook for the technologist engineer and user*. 3a. ed. Hanser Publisher. 644 p.
- Shah A.A., Hasan F., Hameed A. y Ahmed S. (2008) Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnol. Advan.* 26, 246-265.
- Shimao M. (2001). Biodegradation of plastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 242-247.
- Sodhi G.S. (2000). *Fundamental concepts of environmental chemistry*. Alpha Science International, Oxford. 581 p.
- Solis S. (2005). Hongos que eliminan contaminantes. *Rev. Instituto Tecnológico de Mérida* 22, 10-11.
- Sundarapandiyam S., Ramanaiah B., Chandrasekar R. y Saravanan P. (2010). Degradation of Phenolic Resin by *Trametes versicolor*. *J. Polym. Environ.* 18, 674-678.