



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Identificación y evaluación del crecimiento sobre Di (2  
etilhexil) ftalato de cepas de hongos aisladas del proceso  
de reciclado de una industria productora de papel

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a:

Ing. Martín Cuamatzi Muñoz

Director Dra. María del Carmen Sánchez Hernández

Comité tutorial: Dr. Gerardo Díaz Godínez  
Dr. Octavio Loera corral  
Dr. Francisco José Fernández Perrino

Tlaxcala, Tlax.

Enero 2011



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



Maestría en Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis de **Martín Cuamatzi Muñoz**, realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Identificación y evaluación del crecimiento sobre Di (2-etilhexil) ftalato de cepas de hongos aisladas del proceso de reciclado de una industria productora de papel”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A tentamente  
Tlaxcala, Tlax., enero 19 de 2011

DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL  
DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ  
DRA. BLANCA ROSA RODRÍGUEZ PASTRANA  
DR. SAUL TLECUITL BERISTAIN  
DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:  
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por permitirme formar parte de su posgrado y contribuir así a mi formación como investigador.

Al CONACYT por la beca de Maestría No. **218175** así como por el apoyo financiero a la realización del este proyecto.

A los Doctores María del Carmen Sánchez Hernández, Gerardo Díaz Godines, Octavio Loera corral y Francisco José Fernández Perrino por compartir sus conocimiento y experiencias conmigo, además de brindarme todo su apoyo en todo momento.

A los miembros del jurado los Doctores Blanca Rosa Rodríguez pastrana, Daniel Méndez Iturbide y Saúl TlecuilBeristain



## **DEDICATORIA**

### **A mis padres:**

#### **Cristian Muñoz Cuamatzi y Rosa Cuamatzi Reyes**

Por darme la vida e impulsar y apoyarme incondicionalmente para lograr todas las metas que me he propuestos, por enseñarme que con trabajo se puede llegar a las metas establecidas y principalmente por su gran amor co que me han guiado durante todo mi vida.

### **A mi esposa Obdulia Ávila Nava**

Por apoyarme en todo momento en las decisiones que e tomado, por su interés en mis metas y por su gran amor que me a brindado siempre.

### **A mis hijos**

#### **José Carlos y Eduardo**

Por ser los que más adoro en la vida ya que no les e bridado el tiempo necesario para estar junto a ustedes, por ser unos niños lindos que me quieres sin condiciones y sobre todo por el amor de hijos que se otorga incondicionalmente.

### **A mis hermanos:**

#### **Francisco, Fortino, Magdalena, Alejandra, Norberto y Fernando**

Por su compañía y apoyo con los que sé que cuento siempre, porque me han impulsado a tratar de ser mejor cada vez y por que sé que junto connigo trabajan duro para formar la familia que nuestros padres desean formar.

### **A mis amigos**

#### **Verónica, Nerit, José Luis, Winfield, Arashi y Montalvo**

Por su amistad y compañía, por su apoyo durante el trabajo y sus criticas y sus criticas, así como los ratos amenos que disfrutamos juntos y acompañarme en los malos momentos de la vida.



## RESUMEN

Di (2 etilhexil) ftalato (DEHF) es un plastificante que es adicionado al policloruro de vinilo para proporcionarle flexibilidad y elongación, este compuesto no se encuentra adherida a la matriz del PVC, por consecuencia puede migrar hacia el ambiente así como a los productos que se encuentran en contacto con el. En estudios realizados en laboratorio a mostrado alta toxicidad, provocando esterilidad, malformaciones esqueléticas, absorción fetal, hipospadia y cáncer.

Debido a esto y otras anomalías de sumo interés que provoca ha los organismos que se encuentran en contacto con el. Se realizan estudios microbiológicos para la eliminación de DEHF en el ambiente. Un método para eliminarlo es la utilización de microorganismos, como son bacterias y hongos, que degraden al compuesto.

Este trabajo se caracterizó por el aislamiento de cepas fúngicas dentro del proceso de reciclado de un industria productora de papel. De las que se aisló un total de 49 cepas. La cepas que se utilizaron en está investigación fueron la cepa A1 que corresponde a *Neurospora*, la cepa B *Aspergillusniger*, E13 que resultó ser *Hypocrealixii*.

Se observó que las tres cepas fúngicas aislados de la industria recicladora de papel e identificados, crecieron en presencia de DEHF, siendo las cepas *Neurospora* y *Aspergillusniger* las que muestran mayor probabilidad de degradar al compuesto, ya que la densidad de biomasa se incremento al incrementarse la concentración del xenobiótico, y la cepa *Hypocrealixii* mostró ser al menos tolerante a las concentraciones de DEHF empleadas en este estudio.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1. Di (2-etilhexil) ftalato .....	6
1.2. Diversidad microbiológica en ambientes contaminados.....	9
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
5.1. Objetivo general .....	16
5.2. Objetivos particulares.....	16
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<b>6.2. Identificación molecular de los hongos</b> .....	<b>17</b>
6.2.1. Extracción de ADN de los hongos .....	17
6.2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	19
6.2.3. Identificación molecular de los hongos .....	20
6.2.4. Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR) .....	21
6.2.5. Procedimiento experimental PCR .....	23
6.2.6. Purificación y secuenciación de la amplificación obtenida.....	25
<b>6.3. Velocidad de crecimiento radial</b> .....	<b>25</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
7.1. Número de cepas aisladas .....	27
7.2. Identificación de los hongos.....	28
7.2.1. Extracción de ADN de los hongos .....	28
7.2.2. Amplificación por PCR de la secuencia ITS del rADN .....	28
7.2.3. Secuenciación y análisis de las secuencias de los hongos.....	29
7.3. Cuantificación de la velocidad de crecimiento radial .....	31
<b>8. DISCUSIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>10. PRESPECTIVAS</b> .....	<b>34</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>35</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura química del Di (2-etilhexil) ftalato (DEHF).....	7
Fig. 2. Representación esquemática de los mecanismos de resistencia de los hongos..	12
Fig. 3. Esquema de la región del ADN para los genes del rRNA que fueron amplificados por PCR para la identificación de hongos.....	21
Fig. 4 Esquema de la reacción en cadena de ADN polimerasa.....	23
Fig. 5. Se muestran los tamaños que cada uno de los marcadores utilizados (1) Marcado 1 kb y (2) HindIII.....	25
Fig. 6. Cepas seleccionadas para ser identificadas. ....	27
Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 % del ADN total obtenido de cada muestras de hongos. ....	28
Fig. 8. Amplificación de las secuencias ITS que flanquean a los genes ribosomales....	29



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de agarosa y tamaño de fragmentos de ADN.....	19
Tabla 2. Composición de las mezclas para correr los geles de agarosa.....	20
Tabla 3. Mezclas para PCR. ....	24
Tabla 4. Ciclos empleados en el PCR.....	24
Tabla 5. Número de cepas aisladas de las diferentes etapas del proceso de reciclado de papel.....	27
Tabla 6. Comparación de la secuencia de ITS de cada una de las cepas con secuencias existentes en el banco de genes (NCBI).....	30
Tabla 7. Velocidades de crecimiento radial de las cepas identificadas, desarrolladas sobre Medio Mineral (MM), 500 y 1000 mg/l de DEHF.....	31
Tabla 8. Densidad de biomasa de las tres cepas identificadas, desarrolladas sobre MM, 500 y 1000 mg/l de DEHF. ....	32

## 1. INTRODUCCIÓN

Los ftalatos son un grupo de sustancias químicas sintéticas, relacionadas estructuralmente con el ácido ftálico, estos compuestos son conocidos como plastificantes. Dentro de los ftalatos más empleados se encuentra el Di (2-etilhexil) ftalato (DEHF). El propósito general de los ftalatos es proporcionar flexibilidad y elongación al policloruro de vinilo (PVC) (Nalli y cols. 2002, Kim y cols. 2003, Quan y cols. 2004, Hauser y Calafat, 2005), por lo que están presentes en una amplia gama de productos industriales, para el hogar e incluso de higiene personal como productos empaques para alimentos, aceites lubricantes, componentes para automóviles, pinturas, cristales de seguridad, cables eléctricos, cosméticos, detergentes, tuberías, revestimientos para pisos y paredes, materiales de techado, adhesivos, tintes, calzado, artículos de papelería, productos farmacéuticos, utensilios médicos, champús y juguetes (Kim y cols. 2002, Kim y cols. 2003, Quan y cols. 2004, Hauser y Calafat, 2005, Kim y cols. 2007). Aún en el papel destinado al contacto con alimentos, se encontró un alto contenido de DEHF, en concentraciones de 50 a 159 ppm de éste compuesto.

La ingestión y exposición dérmica se consideran importantes rutas de exposición a éste compuestos. La exposición vía oral es por el consumo de productos alimenticios, que se encuentran en contacto con empaques de PVC conteniendo DEHF, si consideramos que en la manufactura de los alimentos se encuentran en contacto constante con utensilios de plástico conteniendo DEHF, y la exposición por vía dérmica es por la utilización de productos cosméticos que contienen DEHF, otra vía es por inhalación de polvo con partículas de DEHF adheridas (Hauser y Calafat 2005). Se ha estimado que el promedio de consumo indirecto de estos compuestos por el humano es de 8 mg/persona/día (CERHR 2006). La producción de DEHF tan solo en los Estados Unidos de Norteamérica es de alrededor de 500 millones de kilogramos por año (CERHR, 2006). El DEHF puede ser liberado al medio ambiente por agua y aire (Kim y cols. 2002, Kim y cols. 2003, Ahn y cols. 2004, Kim y cols. 2007).

Otros estudios, reportan que algunos de estos compuestos se consideran carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos (Cartwright y cols. 2000, Niazi y cols. 2000). También se han

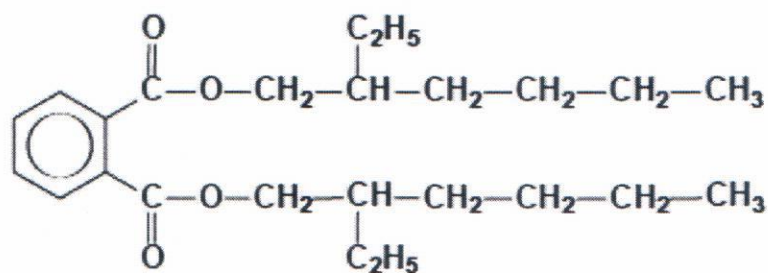
mostrado que los ftalatos pueden afectar a nivel endocrino y el desarrollo de algunos animales (Latini 2005). Sin embargo, Hauser y Calafat (2005) observaron que los ftalatos al entrar en un organismo son rápidamente metabolizados y excretados en orina y heces. El Centro de Información sobre Ftalatos (PIC 2007) reportó que el riesgo de estos compuestos al sistema reproductivo y a la salud en general es mínimo o nulo.

Mellado y cols. (2002), reportaron una serie de mecanismos que los organismos desarrollan permitiéndoles sobrevivir en ambientes contaminados. Se clasifican en resistencia intrínseca, primaria y/o adquirida. En estudios recientes, aislaron de suelos contaminados con petróleo, un total de 240 cepas fúngicas agrupadas en 15 géneros, que mayoritariamente correspondieron a los géneros *Penicillium*, *Absidia* y *Mortierella*, con la capacidad de degradar hidrocarburos. Se han aislado microorganismos en ambientes contaminados con altos contenidos de dimetil ftalato, dietil ftalato, di-n-butil ftalato, di-isobutil ftalato, di-n-octil ftalato, y DEHF, los cuales pueden degradar ésteres de ftalato como es el caso de *Pseudomonas fluorescens* FS1, este tiene la habilidad de utilizar a estos compuestos como única fuente de carbono y energía (Zeng y cols. 2004).

### **1.1. Di (2-etilhexil) ftalato**

La estructura química de DEHF consiste en un anillo aromático con dos cadenas hidrocarbonadas y dos ramificaciones de tipo etilo (Fig. 1). Dada la estructura química, este compuesto puede ser asimilable por algunos organismos.





**Fig. 1. Estructura química del DEHF.**

Cabe mencionar que México participa en el convenio de Estocolmo, que establece la eliminación de algunos productos químicos como los organoclorados, compuestos químicos a base de estructuras cicladas más cloro unido a su estructura, incluyendo al DEHF como un compuesto que se encuentra en los productos utilizados dentro de la industria y de uso personal (Yarto y cols. 2003). El DEHF tiene un amplio margen de toxicidad en los organismos que se encuentran expuestos al plastificante, una manifestación son la anomalías del sistema reproductivo. El Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos (DHHS), ha determinado que es razonable predecir que el DEHF es carcinogénico en seres humanos. Por otra parte la EPA (Environmental Protection Agency), determina que el DEHF es probablemente carcinogénico en seres humanos. Estas aseveraciones se basaron en trabajos de investigación realizados en roedores que fueron expuestos al plastificante observando cáncer de hígado al término de las evaluaciones. Pero la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 2000), ha declarado que el DEHF no puede ser clasificado en cuanto a su carcinogenicidad en seres humanos. Sin embargo, en exposiciones orales a DEHF, este es rápidamente hidrolizado en el intestino por enzimas lipasas, siendo adsorbido como MEHF (Kurahashi y cols. 2005, Bhattacharya y cols. 2005).

Las exposiciones de niños prematuros a ftalatos por los tratamientos a los que se les somete en terapias intensivas neonatales con contacto a plásticos, resulta en la disminución de pesos con respecto a niños sin tratamiento con utensilios plásticos. El DEHF es conocido por su toxicidad testicular en evaluaciones con animales en laboratorio (Kurahashi y cols. 2005). El metabolito responsable de la toxicidad del DEHF es el Mono Etilhexil Ftalato (MEHF)

(Bhattacharya y cols. 2005, Chandrasekaran y cols. 2006), debido a la afinidad del compuesto que tiene con las células de Sertoli disminuyendo la maduración espermática, resultando esterilidad y atrofia testicular (Parks y cols. 2000). Por otro lado, en las exposiciones a DEHF se observa anormalidades del sistema reproductivo, como malformaciones del pene, disminución del descenso testicular, desarrollo pobre de próstata y vesícula seminal.

La toxicidad que manifiestan las ratas en desarrollo al ser expuestas al plastificante, es relacionado con la destrucción de células germinales. Estas son llevadas a decrecer la producción espermática. El punto de acción de los plastificantes es sobre la proteína TRP53, de la misma manera las proteínas CASP8 y FADD, las cuales regulan la apoptosis. Se ha establecido que en general depende del daño físico como químico que ocasiona el tóxico al ser expuestos los testículos (Bhattacharya y cols. 2005, Chandrasekaran y cols. 2006).

Los ftalatos son conocidos por su acción en cuanto a la proliferación de peroxisomas en las células de los organismos que se encuentran en contacto con ellos, dando una denominación como proliferadores de peroxisomas (PPs) (Bhattacharya y cols. 2005). Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), son una familia de factores de transcripción nucleares que pertenecen a la superfamilia de receptores esteroideos.

La familia de PPARs incluye a PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2. Los PPARs forman un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen a elementos de respuesta presentes en los genes blancos. Ellos controlan la expresión de genes de la síntesis y de la oxidación de ácidos grasos, y están involucrados en el almacenamiento de ácidos grasos en diferentes tejidos. A su vez se localizan en la mayoría de los tejidos, siendo el PPAR $\alpha$  la forma más abundante en el hígado y el músculo esquelético, mientras que el PPAR $\gamma$  se localiza principalmente en el tejido adiposo. Los ligandos naturales de los PPARs son los ácidos grasos poliinsaturados (Bhattacharya y cols. 2005).

Miura y cols. (2007), evaluaron los efectos del DEHF en hígado, riñón y páncreas de ratones alimentados por 10 días con dietas al 2% de DEHF, y observaron un aumento en el estrés



oxidativo dentro de los órganos (hígado, riñón y páncreas) evaluados, por la presencia de radicales libre como son óxido de nitrógeno, por la peroxidación de óxido nítrico.

Con respecto a los efectos que se tiene por la inhalación de DEHF, se ha estudiado en ratas con dosis de 5 o 25 mg/m<sup>3</sup> inhalatorias de DEHF con exposiciones de 6 h por 4 y 8 semanas, resultando en el aumento en la concentración de testosterona, relacionado al aumento de peso en las vesículas seminales (Kurahashi y cols. 2005). Por otro lado, un estudio que realizó Bhattacharya y cols. (2005), en cuanto a los daños causados en testículos y en hígado, observo que causa degeneración testicular, proliferación anormal de hepatocitos y carcinogénesis. En esta evaluación se observó que la muerte celular programada (apoptosis) se presentó en testículos, pero no hubo cambios significativos en hígado analizado en los mismos animales. En cuanto al análisis de PPARs, así como a receptores del ácido retinoico, se tiene la misma abundancia en testículos como en hígado.

Tomita y cols. (1986), determinaron que la administración oral de 1ml de DEHF/kg a ratonas de 8 días de gestación, resultaron en la obtención de menos del 32% de fetos vivos, todos con deformaciones. Cuando se administraron 10 ml de DEHF /kg a ratonas preñadas de 8 días de gestación, encontraron remanentes en los fetos aproximadamente un 0.03% y 0.003% después de 12 h de la administración con DEHF y MEHF respectivamente.

## **1.2. Diversidad microbiológica en ambientes contaminados**

La contaminación ambiental es causada por una amplia gama de componentes químicos desechados por las industrias, autos y actividad social en general (Kumar y cols. 2005, Romero y cols. 2006). Miles de sitios de desechos peligrosos han sido generados por todo el mundo resultado de acumular xenobióticos en suelo y agua a lo largo de los años (Rivera-Cruz y cols. 2002). El petróleo crudo puede estar constituido por compuestos nitro-aromáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y compuestos orgánicos halogenados (Harayama y cols. 1999, Rivera-Cruz y cols. 2002, Kumar y cols. 2005).



Debido a la complejidad que tienen estos contaminantes la mayoría de los microorganismos no pueden crecer en este tipo de ambientes, aunque existe una tolerancia que tienen algunos que les permite sobrevivir en estrés, dando como consecuencia la selectividad natural de organismos que puedan existir en estos ambientes. Las estrategias de remediación físico-químicas para limpiar sitios contaminados no son rentables o adecuadas (Kumar y cols. 2005) y la búsqueda de métodos biológicos se está incrementando (Martín y cols. 2004) utilizando microorganismos para degradar y eliminar contaminantes (Rivera-Cruz y cols. 2002, Martín y cols. 2004, Benavides y cols. 2006).

La biorremediación implica el uso de microorganismos para la recuperación del medio ambiente (Kumar y cols. 2005, Udeani y cols. 2009). Rivera-Cruz y cols. (2002), la definen como la aplicación de procesos biológicos a tratamientos de descontaminación debido a la versatilidad metabólica de los microorganismos generada en presencia de contaminantes (Kumar y cols. 2005, Benavides y cols. 2006).

Dentro de microorganismos aislados de ambientes contaminados se encuentran *Aspergillus sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma* (Rivera-Cruz y cols. 2002), *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Rhodococcus* (Benavides y cols. 2006), *Talaromyces helicus* (Romero y cols. 2006), *Pseudomonas sp.* (Arun y cols. 2008), *Bacillus Searothermophilus*, *Cyanobacteria* (Udeani y cols. 2009).

El uso de microorganismos en procesos de biorremediación implica conocer su comportamiento en diferentes condiciones ambientales, determinando el tipo y velocidad de degradación de compuestos xenobióticos, así como el efecto de agregado de nutrientes, oxígeno, otros factores que pueden favorecer el crecimiento y metabolismo de microorganismos (Rivera-Cruz y cols. 2002). Debe destacarse que normalmente se realizan las evaluaciones en condiciones ideales de crecimiento (temperatura, oxígeno, agitación energética, mezcla homogénea de agua y suelo). Por ello, se espera que la degradación en situación real, llevada en ambientes abiertos, ocurra lentamente. Es también importante

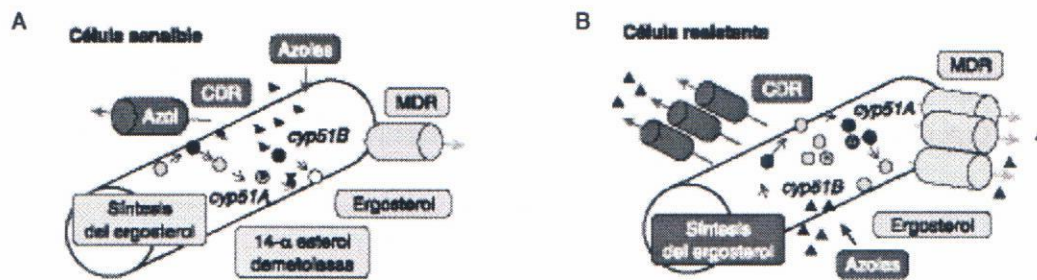
realizar ensayos de toxicidad (Rivera-Cruz y cols. 2002), ya que, estos organismos podrían no reducir la toxicidad de los xenobioticos, puesto que se ha visto que en algunas ocasiones resulta el aumento en efectos adversos al ambiente.

Los microorganismos que han mostrado capacidad de degradar compuestos xenobióticos, seguramente desarrollaron en primera instancia resistencia secundaria que les permitió sobrevivir en ambientes contaminados (Fig. 2).

La resistencia de los hongos frente a contaminantes es un concepto amplio que puede clasificarse como resistencia microbiológica (Mellado y cols., 2002). Esta se puede subdividir en:

- a) Resistencia intrínseca o innata, que es la que presentan todas las cepas de una misma especie de hongos. Sin tener ninguna relación con la exposición a compuestos químicos.
- b) Resistencia primaria, es cuando una especie de cepas normalmente sensibles a un antifúngico aparece de forma espontánea cepas resistentes, sin haber estado en contacto previo con el antifúngico.
- c) Resistencia secundaria o adquirida, es el desarrollo de mecanismos de resistencia después de la exposición a los antifúngicos y que puede ser debida a alteraciones fenotípicas o genotípicas que se manifiestan de forma estable o transitoria.





**Fig. 2. Representación esquemática de los mecanismos de resistencia de los hongos.**

En el hongo sensible el antifúngico interacciona con la diana (14- $\alpha$  esterol demetilasa, producto de gen CYP51) bloqueando las síntesis del ergosterol e inhibiendo el crecimiento del mismo (Fig. 2A). El hongo resistente puede defenderse: aumentando las bombas de eliminación activa (MDR y CDR), que disminuiría la concentración intracelular del antifúngico; aumentando el número de copias de la diana (CYP 51A y/o CYP51B) de forma que la interacción del antifúngico con la diana sea ineficiente (Fig. 2B).

En términos generales, los mecanismos de resistencia identificados por los que una célula fúngica sensible se hace resistente, es por la incapacidad del fungicida para alcanzar el sitio sensible dentro de la célula (diana), modificación en las enzimas de las rutas metabólicas, alteración en el procesamiento intracelular (Mellado y cols., 2002). La incapacidad del fungicida para alcanzar la diana dentro de la célula, puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior (Bossche, 1997), por otro lado, esto puede ser por aumento del número de copias de la diana o modificaciones debido a mutaciones. No obstante podría ser por modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas. Mutación de las mitocondrias que se realiza en el gen para la síntesis de la enzima citocromo B. Así mismo, alteración en el procesamiento intracelular (degradación o modificación) del antifúngico (Mellado y cols., 2002).

Las modificaciones, alteraciones morfológicas o fenotípicas, que sufre un organismo



incrementan las posibilidades de que este ocupe a un fungicida dentro de su metabolismo. Resultando en la degradación del compuesto en subunidades más pequeñas. Con disminución de la toxicidad del compuesto inicial. De tal forma que sería inocuo al ambiente al que se desecha.

En específico, los hongos cuentan con enzimas capaces de degradar una amplia gama de compuestos xenobióticos. Los hongos de pudrición blanca excretan enzimas tales como las lacasas, fenoloxidasas, manganeso peroxidasas, lignin peroxidasas. Por lo anterior, las cepas fúngicas tienen la posibilidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).

## 2. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios sobre la degradación de Di (2-etilhexil) ftalato (DEHF). Chai y cols. (2008) consideran que, la mejor ruta de degradación, es la microbiológica utilizando bacterias y hongos. Quan y cols. (2004) realizaron un estudio con una cepa de *Bacillus subtilis*, observando su capacidad de degradar el DEHF, di-butil ftalato, di-etil ftalato, di-pentil ftalato, di-propil ftalato y ácido ftálico como fuentes de carbono. La biodegradación del DEHF fue de más del 99% a una concentración inicial de 1350 mg/l cuando se incubó a 30 °C durante 5 días. En suelo, la remoción fue cercana al 80% cuando se adicionó un 8% del medio de cultivo conteniendo sales minerales más extracto de maíz.

Por otra parte, Neelakanteshwar y cols. (2006), aislaron la bacteria *Delftia sp.*, utilizando la técnica de enriquecimiento. Ésta fue capaz de utilizar di-*n*-butil ftalato como única fuente de carbono y energía. Además, han reportado que especies de *Bacillus* mostraron la capacidad de utilizar dimetil ftalato como única fuente de carbono y energía (Niazi y cols. 2000). Sin embargo, *Rhodococcus rhodochrous* no creció en presencia de dioctilftalato, bis-2-etilhexiladipato, dioctil ftalato, a menos que otro compuesto estuviera presente como fuente de carbono como es el hexadecano (Nalli y cols. 2002).

Cosgrove y cols. (2007), estudiaron las comunidades de hongos que participan en la

biodegradación de poliéster de poliuretano (PU). El PU fue sometido a condiciones anaerobias en dos suelos de arcilla arenosa a diferentes niveles de carbono orgánico y dos diferentes pH (5.5 y 6.7). Después de 5 meses, los hongos que se desarrollaron en la superficie de PU se aislaron para compararlas con los organismos nativos del suelo. Se observó que el PU fue degradado por los hongos aislados y por las cepas nativas del suelo (*Geomyces pannorum* y un *Phoma* sp.).

Weeb y cols. (2000), estudiaron el efecto de la exposición de PVC que contenía di-octil ftalato como plastificante al medio ambiente durante dos años. Después de este lapso se cuantificaron e identificaron las poblaciones de hongos y de bacterias. La Bacteria *Aureobasidium pollulans* fue la principal colonizadora del PVC. Entre las 25 y 40 semanas de exposición también se observaron hongos y levaduras, entre estos *Rhodotorula aurantiaca* y *Kluyveromyces* sp. Se observó que la cepa fungica *Aureobasidium pollulans* fue capaz de crecer sobre PVC y de esta manera utilizar el plastificante para su crecimiento.

En estudios de degradación enzimática en el que se utilizó la cutinasa, (enzima lipolítica que degrada a la cutina), se evaluó la degradación de Di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) encontrando que casi el 70% de la concentración inicial de este compuesto se degradó en 4.5 h. (Kim y cols. 2007).

Chang y cols. (2008), estudiaron el efecto de un pretratamiento de ultrasonificación en la degradación aerobia de cuatro ftalatos: dietil ftalato, benzil butil ftalato, butil ftalato, y DEHF en lodos activados, encontraron que la combinación del pretratamiento de ultrasonificación y biodegradación remueven de manera efectiva los ftalatos presentes en los lodos activados. Por otra parte, las cepas de hongos aislados de suelo y desarrollados sobre DEHF mostraron producción de biomasa después de 20 días de fermentación conteniendo 50 µl de DEHF como única fuente de carbono y energía por 50 ml de medio de cultivo (Sánchez y cols. 2009).

Chai y cols. (2008), evaluaron la degradación de DEHF por 14 cepas de hongos, encontraron que 9 de éstas, degradaron más del 50% a una concentración inicial de 40 ppm, posteriormente



observaron que *Fusarium oxysporum* fue el hongo con mayor efectividad en degradar más del 98% de este plastificante en 7 días de fermentación líquida. En estudios similares en cuanto a la degradación de plastificantes, Hwang y cols. (2008), encontraron que *Pleurotus ostreatus*, degradó diferentes ftalatos (dietil ftalato, dimetil ftalato, butilbenzil ftalato) a una concentración de 100 mg/L, con una eficiencia del 14.9%, con respecto a la concentración inicial de los diferentes ftalatos evaluados después de 4 días de incubación.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El Di (2-etilhexil) ftalato es contaminante del medio ambiente y tóxico para el humano. Este compuesto es frecuentemente descargado al ecosistema por las industrias papeleras y de plásticos. Algunos organismos encontrados en ambientes contaminados, pueden desarrollar mecanismos que les permite sobrevivir, utilizando los compuestos presentes en esos ambientes como fuentes de carbono y energía. Estos organismos podrían utilizarse en procesos de biorremediación; por lo que, en esta investigación se propone aislar cepas del proceso de reciclado de una industria productora de papel, así como identificar y determinar su velocidad de crecimiento radial sobre un medio que contenga DEHF, siendo estos estudios, las bases para estudios posteriores de degradación de ftalatos.



#### **4. HIPÓTESIS**

Existen hongos que crecen en presencia de DEHF, aislados del proceso de reciclado de la industria productora de papel.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Obtener, identificar y caracterizar cepas de hongos aisladas del proceso de reciclado de una industria productora de papel, que sean capaces de crecer sobre un medio que contenga DEHF.

##### **5.2. Objetivos particulares**

- Aislar cepas presentes en el proceso de reciclado de una industria productora de papel que sean capaces de crecer sobre un medio que contenga DEHF.
- Identificar por métodos moleculares mediante la amplificación de los fragmentos ITS tres cepas de hongos aisladas el proceso de reciclado de una industria productora de papel que sean capaces de crecer sobre un medio que contenga DEHF.
- Determinar la velocidad de crecimiento radial de tres cepas de hongos aislados del proceso de reciclado de una industria productora de papel, que sean capaces de crecer sobre un medio que contenga DEHF.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Aislamiento de cepas de hongos**

Se tomaron muestras en condiciones asépticas de 5 etapas del proceso de reciclado de una industria productora de papel ((1) pulpeo, (2) material que contiene biocida, (3) desechos del pulpeo que se destinan para relleno sanitario, (4) material destinado para la realización de base de cartón para huevo y (5) aguas residuales del proceso). Se realizaron resiembras sucesivas sobre agar extracto de malta para obtener los hongos.

### **6.2. Identificación molecular de los hongos**

#### **6.2.1. Extracción de ADN de los hongos**

Este procedimiento se inició desde el crecimiento del hongo para obtener micelio. La extracción del ADN se hizo empleando metodología previamente descrita (Fernández 1997). Matraces de 250 ml conteniendo caldo extracto de malta se inocularon con 3 fragmentos de micelio de 4 mm de diámetro cortados de la periferia de una colonia desarrollada en agar extracto de malta a 25°C por 7 días. Estos matraces se incubaron durante 48 h a 30°C y 200 rpm. Después del crecimiento del hongo, el micelio se filtró a través de tela Nital estéril. El micelio obtenido después del filtrado se lavó con 250 ml de solución salina (NaCl estéril al 0.9%) y posteriormente con 250 ml de tampón A<sup>1</sup>. Después del lavado, se eliminó la humedad del micelio con papel filtro estéril. El micelio seco se colocó en una caja Petri desechable estéril, se refrigeró a -80°C hasta congelación. Una vez congelado el micelio, se liofilizó para eliminar humedad. El micelio después de liofilizado se pulverizó en un mortero estéril. El polvo obtenido se guardó en tubos Eppendorf de 1.5 ml hasta un volumen de 0.5 ml del tubo (aproximadamente 100 mg de micelio pulverizado), conservándose a -20°C hasta su uso.

---

<sup>1</sup> **Tampón A:** EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.0

Para la extracción de ADN se agregó a los tubos con polvo de micelio 0.5 ml de tampón de ruptura I<sup>2</sup>, se homogenizó la muestra y posteriormente se añadió 0.5 ml de fenol neutro<sup>3</sup> y 0.5 ml de CIA<sup>4</sup>. Se mezclaron con suavidad, y se incubaron a 50°C durante 20 minutos. A los diez minutos de incubación se mezcló con suavidad de nuevo la mezcla. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la centrifugación se formaron dos fases, una acuosa (superior) y una fenólica (inferior). Se recuperó la fase acuosa para ser desproteinizada mediante extracciones sucesivas con fenol-CIA hasta que se obtuvo una fase limpia (se necesitan de 6 a 7 extracciones). Posteriormente se hizo una nueva extracción con CIA al mismo volumen de la fase acuosa, se mezcló, centrifugó y se extrajo la fase acuosa, que se colocó en un tubo Eppendorf nuevo y estéril. A la fase acuosa recuperada se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se incubó a 4°C durante 1 día. Después de este tiempo se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se tiró el sobrenadante y al precipitado se le agregó 1 ml de etanol al 70% (v/v). Finalmente se mezcló y centrifugó el precipitado con el etanol a 14,000 rpm durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante y se dejó secar el precipitado. Al precipitado seco se le agregó 20 µL de TAE<sup>5</sup> y se conservó a -20°C.

---

Tampón A<sup>2</sup>: EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 150 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.0

Tampón de ruptura I<sup>2</sup>: EDTA 100 mM pH 8.0, SDS al 1% (p/v) y Tris-HCl 0.2M. Se ajustó el pH a 8.2 con HCl.

Fenol neutro<sup>3</sup>: Se prepara el fenol ácido mezclando 500 ml de fenol sólido con 500 ml de H<sub>2</sub>O, se agitó y se dejó reposar 24 horas en un frasco ámbar a 4°C, posteriormente se retiró la fase superior acuosa. Se mezclaron 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Se mantuvo la mezcla en reposo hasta que se separó la fase acuosa de la fase fenólica. Los lavados con Tris-HCl 1 M pH 8.0 se realizaron hasta obtener un pH cercano a 7.0. Este fenol se conservó a 4°C en recipientes protegidos de la luz.

CIA<sup>4</sup>: Por cada 24 volúmenes de cloroformo se puso 1 volumen de alcohol isoamílico.

TAE<sup>5</sup>: EDTA 1 mM (pH 8.0) y Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)



**Tabla 2. Composición de las mezclas para correr los geles de agarosa.**

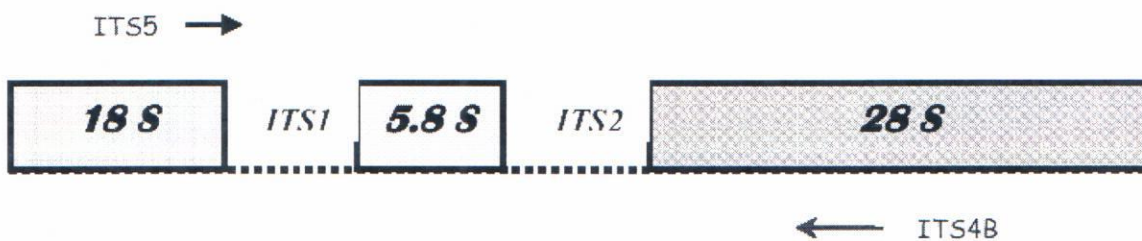
Muestra	H <sub>2</sub> O	ADN	Tampón de carga 6x	Volumen final
Marcador	13 µL	5 µL	2 µL	20 µL
Hongo A1	15 µL	3 µL	2 µL	20 µL
Hongo B	15 µL	3 µL	2 µL	20 µL
Hongo E13	15 µL	3 µL	2 µL	20 µL

Las muestras de ADN preparadas se calentaron durante 10 minutos a 65°C, enfriándose posteriormente en baño de hielo y agua durante 3 minutos. Las muestras de ADN fueron cargadas en los pocillos del gel y la electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1x mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 voltios cm<sup>-1</sup>. El ADN se tiñó con una solución de bromuro de etidio<sup>8</sup> (BrEt) en una concentración final de 0.5 µg ml<sup>-1</sup>. El bromuro se intercala en la doble cadena del ADN y emite fluorescencia tras iluminarse el gel con luz ultravioleta, utilizando un equipo de foto-documentación Gel Doc II (Bio-Rad). Se utilizó ADN del fago λ digerido con la enzima *Hind*III como marcador y 1kb.

### 6.2.3. Identificación molecular de los hongos

Para la identificación molecular de las muestras de hongos se amplificaron los genes ribosomales y sus espacios transcritos internos (ITS) (Carvalho, 2005); ya que estas regiones tienen una organización conservadora en el genoma de todos los eucariontes, tienen un gran número de copias (lo que facilita su amplificación) y tienen regiones muy conservadas en los genes: 18S, 5.8S y 28S (Kenneth y cols., 1998), que están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud y en secuencia, por lo tanto, son muy informativas y representan una huella genómica para cada hongo (Fig. 3).

<sup>8</sup> **Bromuro de etidio:** Se preparó una solución de 10 mg ml<sup>-1</sup> en agua y se conserva a 4°C. Para un litro de agua se requieren 50 µL de esta solución



**Fig. 3. Esquema de la región del ADN para los genes del rRNA que fueron amplificados por PCR para la identificación de hongos.**

Los genes codificantes del rRNA se representan dentro de los rectángulos y las zonas en blanco representan las regiones de los espacios transgénicos internos. Las flechas simbolizan la localización y los cebadores utilizados para la amplificación.

#### **6.2.4. Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa (PCR)**

Esta técnica se basa en la separación de ambas hebras de ADN, la posterior unión de pequeños fragmentos (denominados *primers*) y la extensión de estos fragmentos usando de molde el ADN de la muestra. Así se obtienen dos copias idénticas por cada molécula en cada ciclo de reacción. Para llevar a cabo esta reacción se requiere de una enzima polimerasa que sea capaz de soportar la alta temperatura del proceso de desnaturalización. Esta enzima es una ADN-polimerasa especial obtenida de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*.

La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una de hibridación o alineación y una de elongación:

**1. Desnaturalización:** La desnaturalización permite la separación de las dos hebras del ADN, mediante el calentamiento a una temperatura elevada (92-96°C), que debe ser superior a la temperatura de fusión de la región del ADN que se requiere amplificar.

**2. Hibridación de los cebadores:** Permite, mediante la disminución de temperatura (37 a 67° C, depende de la  $T_m$  de los primers), la reacción de las hebras sencillas tras la desnaturalización térmica. Se requiere un enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión del ADN, de forma que permita la hibridación de las hebras sencillas del ADN con los oligonucleótidos cebadores. Los cebadores o *primers* (oligonucleótidos sintéticos) tienen secuencias complementarias, respectivamente, a los dos extremos 3' de la región del ADN diana, uno en cada hebra. La distancia entre ellos en el conjunto ADN-cebadores determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada.

**3. Elongación (o replicación) a partir de los cebadores:** Esta es la etapa de amplificación de las hebras sencillas de ADN por una ADN polimerasa termoestable a partir de los cebadores (72 a 75°C). La enzima más empleada se llama *Taq* polimerasa, por proceder de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive en manantiales de agua caliente. El sustrato para la síntesis de las innumerables copias del ADN son los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), que deben ir acompañados de  $Mg^{2+}$  como cofactor. En la técnica de reacción en cadena de ADN polimerasa cada conjunto de estos tres pasos (desnaturalización, hibridación, replicación) constituye un ciclo (Fig. 4).



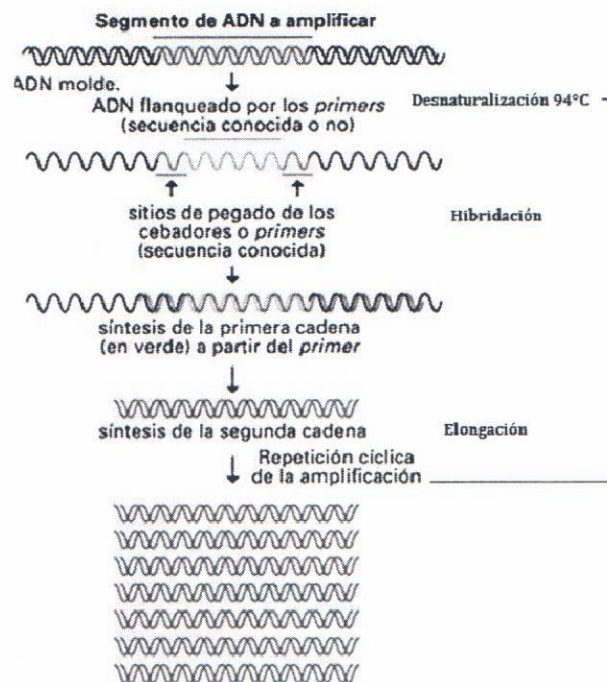


Fig. 4 Esquema de la reacción en cadena de ADN polimerasa.

A medida que aumenta el número de ciclos el producto de la elongación pasa a ser la molécula diana a las que debe unirse perfectamente las moléculas del cebador presentes en la mezcla, conduciendo a una acumulación teórica del producto.

#### 6.2.5. Procedimiento experimental PCR

La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente:

Cebador ITS4b: (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')

Cebador ITS5: (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3')

Se prepararon en tubos Eppendorf de 200  $\mu$ L la siguiente mezcla de reacción, en un baño de hielo y agua (Tabla 3):

**Tabla 3. Mezclas para PCR.**

	CONCENTRACIÓN INICIAL (SOLUCIÓN STOCK)	CONCENTRACIÓN FINAL	MASTER MIX	VOLUMEN DE REACCIÓN		
				1 $\mu\text{L}^*$	1 $\mu\text{L}^\dagger$	1 $\mu\text{L}^\ddagger$
ADN molde	-----	-----	-----	1 $\mu\text{L}^*$	1 $\mu\text{L}^\dagger$	1 $\mu\text{L}^\ddagger$
ADN polimerasa	50 unidades $\mu\text{L}^{-1}$	2.5 unidades $\mu\text{L}^{-1}$	2 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$
Buffer	10x	1x	20 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
Mg <sub>2</sub> Cl	50 mM	2.5 mM	10 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$
dNTPs	10 mM	200 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Cebador ITS4b	20 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$
Cebador ITS5	20 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{L}$
dH <sub>2</sub> O	-----	-----	140 $\mu\text{L}$	35 $\mu\text{L}$	35 $\mu\text{L}$	35 $\mu\text{L}$
Volumen final	-----	-----	196 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$

\*ADN de la Cepa A1

†ADN de la cepa B

‡ADN de la cepa E13.

A las mezclas de reacción ya preparadas se les sometió primero a 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, posteriormente se les sometió a 30 ciclos como se describen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Ciclos empleados en el PCR.**

	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
	1	94	2
Desnaturalización	2	94	0.45
Hibridación	3	55	0.45
Elongación	4	72	0.45
	5	repetir 2	30 ciclos
		72	5
		4	3

Después de haber amplificado el segmento de banda se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con un marcador comercial 1 kb ADN Ladder (Promega) de 250 a 10,000 pb como el que se muestra en la Fig. 5.

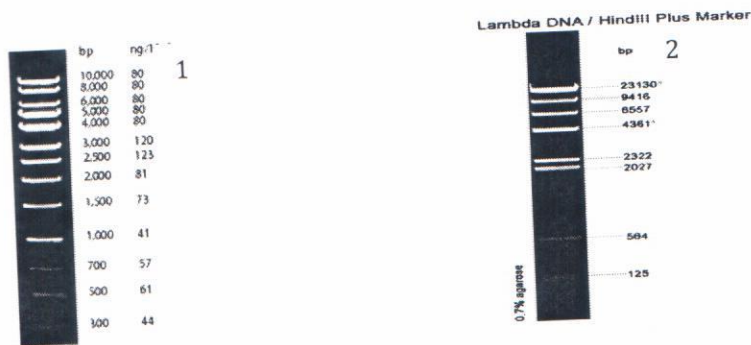


Fig. 5. Se muestran los tamaños que cada uno de los marcadores utilizados (1) Marcado 1 kb y (2) *HindIII*

### 6.2.6. Purificación y secuenciación de la amplificación obtenida

Una vez teñido el gel, se cortó la banda y se procedió a la purificación de los productos de PCR de cada una de las muestras, la cual se realizó con el kit Wizard® SV and PCR Clean-Up System de Promega. Una vez purificada la banda de ADN, se mandó secuenciar en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana campus (Iztapalapa). La reacción de secuenciación se llevó a cabo con Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer). El producto se purificó en columnas Centri Sep con sephadex para eliminar el colorante que no se incorporó en la reacción. Se secuenciaron automáticamente en un equipo ABI PRISM 3100 Avant.

### 6.3. Velocidad de crecimiento radial

La velocidad de crecimiento radial ( $V_r$ ) de las cepas aisladas se evaluó en tres medios de cultivo diferentes: medio mineral (MM) y medio de cultivo conteniendo por separado 1000 y



500 mg de DEHF/l de medio de cultivo. El medio mineral se preparó por litro de agua con 1 gr de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 0.5 gr de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 gr de  $\text{MgSO}_4$ , 0.3 gr de  $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)$ , 0.2 gr de  $\text{FeSO}_4$ , 0.2 gr de  $\text{ZnSO}_4$ , 0.2 gr de  $\text{MnSO}_4$  y 20 gr de agar bacteriológico. El medio de DEHF se preparó con los mismos reactivos del medio mineral más 1000 y 500 mg de DEHF/l de medio de cultivo respectivamente.

El avance radial diario del micelio se determinó en la fase exponencial de crecimiento del hongo, y se empleó la ecuación lineal para el procesamiento de los datos donde la pendiente corresponderá a la  $V_r$ . Los datos se reportan en mm de avance radial micelial por hora.

También se determinó la biomasa al final del avance radial del micelio cuando el hongo llenó caja. La biomasa se determinó por el método del peso seco. Se calentó el micelio en baño maría conteniendo 200 ml de agua destilada a  $60^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Posteriormente, la muestra se filtró con un papel filtro previamente pesado (Whatman #2). Una vez obtenida la biomasa en el papel filtro se puso a secar a  $80^\circ\text{C}$  hasta obtener un peso constante durante 24 h. Transcurrido el tiempo necesario se pesó el papel filtro con la biomasa seca y por diferencia de peso se determinará el rendimiento final (Reeslev y Kjølner, 1995).

## 7. RESULTADOS

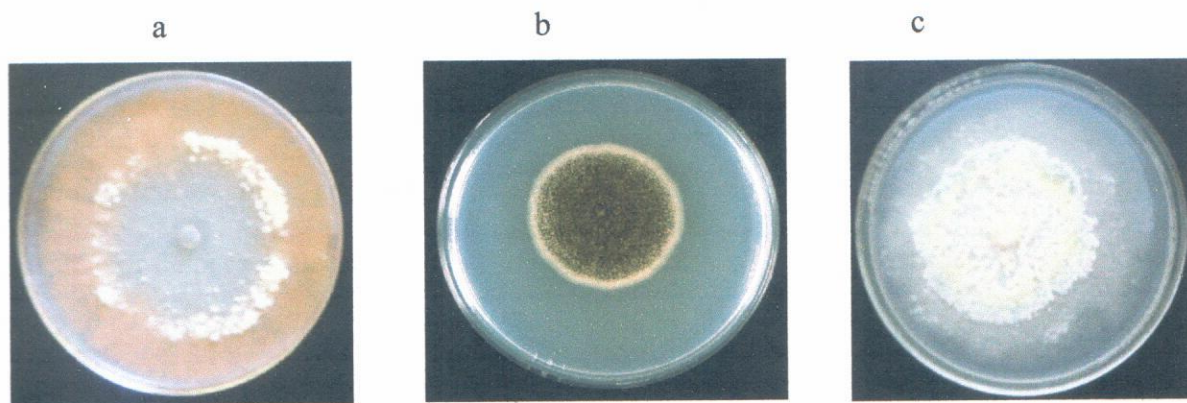
### 7.1. Número de cepas aisladas

El número de cepas obtenidas de las diferentes etapas de reciclado de papel de la industria CELFIMEX S. A. de C. V. se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Número de cepas obtenidas de las diferentes etapas del proceso de reciclado de papel.**

ETAPAS DEL PROCESO	CEPAS AISLADAS
Pulpeo (A)	14
Material que contiene biocida (B)	10
Desechos del pulpeo para relleno sanitario (c)	4
Material para base de cartón para huevo (D)	12
Aguas residuales (E)	9

De los 49 aislados, se tomaron 3 (Fig. 6) para ser identificadas y para determinar su Vr en presencia de DEHF.



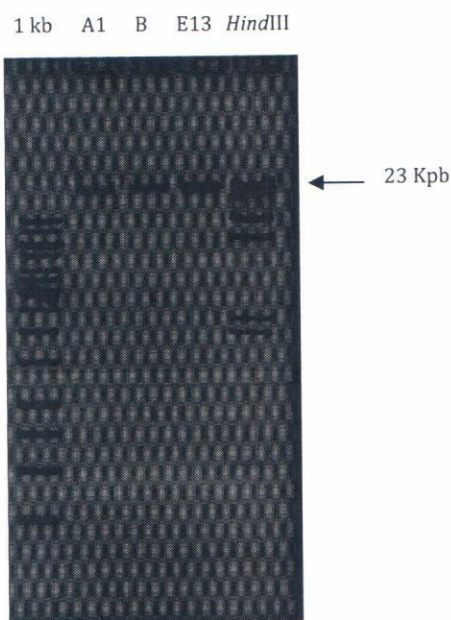
**Fig. 6. Aislados seleccionados para ser identificadas.**

Hongo aislado del pulpeo llamada A1 (a), hongo aislado de las aguas residuales del proceso B (b) y hongo aislado de aguas residuales llamada E13 (c).

## 7.2. Identificación de los hongos

### 7.2.1. Extracción de ADN de los hongos

Se realizó como se describió en el apartado de metodología. En la Fig. 7 se muestra una imagen del gel que contiene el ADN total de las tres muestras, junto con marcador molecular de 1kb y *HindIII*. Se observó que en las tres muestras de hongos se logró purificar el ADN. Aproximadamente fue de tamaño de 23 kpb, el cual se pudo utilizar en la amplificación mediante PCR.



**Fig. 7. Electroforesis en gel de agarosa 0.8 % del ADN total obtenido de cada muestras de hongos.**

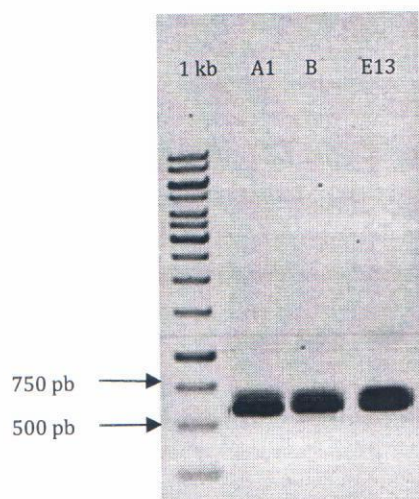
(1) Marcador de peso molecular 1kb, (2) ADN de Hongo A1, (3) ADN de Hongo B, (4) ADN de Hongo E13 y (5) *HindIII*.

### 7.2.2. Amplificación por PCR de la secuencia ITS del rADN

Las secuencias ITS se obtuvieron como se describió en el apartado de metodología. La Fig. 8 muestra el gel de agarosa al 0.8% con los fragmentos de los productos del PCR, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 650 pb, según el marcador ADN Ladder 1kb.



Se ha demostrado que la variabilidad en la secuencia observada en las dos regiones ITS de los genes ribosomales que separan la pequeña subunidad ribosomal 5.8S, han sido determinantes para distinguir un hongo de otro. Esta zona, para hongos tiene un tamaño de 650 a 900 pb (incluye al gen 5.8S). La secuencia obtenida del gen ITS, se puede buscar en el banco de genes (GenBanK), o en la base de datos de nucleótidos del EMPL (European Molecular Biology Laboratory) con el fin de identificar a hongos dentro de una especie o al menos en un grupo de especies (Rodríguez-Tovar y cols. 2004).



**Fig. 8. Amplificación de las secuencias ITS que flanquean a los genes ribosomales.**

Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con los productos del PCR de las muestras de hongos con los primer ITS4B e ITS5. (1) Marcador de tamaño 1kb ADN Ladder. (2) Hongo A1, (3) Hongo B y (4) Hongo E13.

### 7.2.3. Secuenciación y análisis de las secuencias de los hongos

Se cortó la banda de aproximadamente 650 pb, para evitar posibles contaminantes que estuvieran presentes en la muestra e interfirieran en la secuenciación. Posteriormente se hizo la purificación. Una vez obtenidas las secuencias se alinearon mediante el programa (BioEdit) y la secuencia resultante del alineamiento de la secuencia de ambos cebadores, se comparó en el banco de genes. En la Tabla 6 se observa los resultados de la comparación de las tres cepas

con el banco de genes (NCBI). Los porcentajes de similitud que son del 99% respecto a A1 que es *Neurospora tetrasperma*, *Neurospora sitophila*, *Neurospora* sp. En base a los resultado del análisis se puede decir que la cepa A1 se trata de una especie perteneciente a *Neurospora*, para la cepa B el resultado de la secuencia de los ITS fue que es una cepa de *Aspergillus niger*, de las anteriores cepas se obtuvo un 99% de identidad y con respecto a la cepa E13 se obtuvo un 98% de máxima identidad, dando como resultado que pertenece a *Hypocrea lixii*.

**Tabla 6. Comparación de la secuencia de ITS de cada una de las cepas con secuencias existentes en el banco de genes (NCBI).**

No. Acceso	Descripción	% Max ident
<b>Cepa A1</b>		
<u>GU053979.1</u>	Uncultured fungus clone LX041197-122-050-F10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete	99%
<u>AY681194.1</u>	<i>Neurospora tetrasperma</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	99%
<u>AF388926.1</u>	<i>Neurospora sitophila</i> isolate FGSC 1135 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	99%
<u>FJ176470.1</u>	<i>Neurospora</i> sp. ML70 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	99%
<b>Cepa B</b>		
<u>EF175904.1</u>	<i>Aspergillus niger</i> clone bandF8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene	99%
<u>EF151435.1</u>	<i>Aspergillus niger</i> isolate F10 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene	99%
<u>AF455522.1</u>	<i>Aspergillus niger</i> isolate wb209 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	99%
<b>Cepa E13</b>		
<u>HM176572.1</u>	<i>Hypocrea lixii</i> isolate MIAE00042 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	98 %
<u>EF392759.1</u>	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 233353 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	98 %
<u>FJ442679.1</u>	<i>Hypocrea lixii</i> strain GJS 05-107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	98 %



### 7.3. Cuantificación de la velocidad de crecimiento radial

La Vr de las tres cepas identificadas se muestra en la Tabla 7. Las tres cepas mostraron crecimiento en los medio que contenían DEHF, mostrando en general un incremento en la Vr en presencia de DEHF con respecto al medio mineral; considerando que todas las cajas fueron inoculadas bajo las mismas condiciones, se sugiere que el desarrollo micelial que se observó en el MM (sin fuente de carbono) se logró por mecanismos de sobrevivencia de las cepas, retomando sus reservas energéticas para el desarrollo del micelio; por otro lado, el desarrollo de las cepas en presencia de DEHF nos garantiza al menos la tolerancia de estas cepas a este compuesto xenobiótico y que además, en general se observó una relación positiva del aumento de la concentración de DEHF con la Vr.

**Tabla 7. Velocidades de crecimiento radial de las cepas identificadas, desarrolladas sobre MM, 500 y 1000 mg/l de DEHF.**

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	MM (mm/h)	MM+500 mg/l DEHF (mm/h)	MM+1000 mg/l DEHF (mm/h)
A1	1.0641 <sup>b</sup> (0.009)	1.1869 <sup>a</sup> (0.017)	1.0829 <sup>b</sup> (0.023)
B	0.3274 <sup>c</sup> (0.025)	0.4047 <sup>b</sup> (0.005)	0.4778 <sup>a</sup> (0.024)
E13	0.7420 <sup>b</sup> (0.008)	0.4450 <sup>c</sup> (0.009)	0.9665 <sup>a</sup> (0.029)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

Por otro lado, se evaluó la densidad de biomasa producida en los experimentos anteriores, lo cual es un indicador indirecto del consumo del DEHF. Como se observa en la Tabla 8, las cepas A1 y B mostraron un incremento de biomasa en presencia de DEHF, por lo que estas cepas muestran elevadas probabilidades de ser capaces de degradar y metabolizar al DEHF, y la cepa E13 se mostró al menos como una cepa resistente al DEHF.



**Tabla 8. Densidad de biomasa de las tres cepas identificadas, desarrolladas sobre MM, 500 y 1000 mg/l de DEHF.**

CEPA	MEDIO DE CULTIVO		
	MM (g/cm <sup>2</sup> )	MM+500 mg/l DEHF (g/cm <sup>2</sup> )	MM+1000 mg/l DEHF (g/cm <sup>2</sup> )
A1	0.021 <sup>c</sup> (0.001)	0.041 <sup>b</sup> (0.001)	0.060 <sup>a</sup> (0.002)
B	0.030 <sup>c</sup> (0.002)	0.076 <sup>b</sup> (0.001)	0.083 <sup>a</sup> (0.003)
E13	0.038 <sup>a</sup> (0.002)	0.019 <sup>b</sup> (0.001)	0.038 <sup>a</sup> (0.001)

Se reporta la media y entre paréntesis la desviación estándar. Las medias del mismo renglón con diferente letra son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

## 8. DISCUSIONES

Con base en el análisis de comparación de las secuencias obtenida mediante PCR de ITS, la cepa A1 es *Neurospora*, sin embargo no podemos especificar claramente la especie, ya que se obtuvieron dos especies diferentes, sin embargo mediante pruebas morfológicas podemos complementar la identificación. La cepa B correspondió a una cepa de *Aspergillus niger*, ya que fue la única especie que nos dio como resultado en la comparación de la secuencia. La cepa E13 que resultó ser *Hypocrea lixii*. Skamnioti y cols. (2008) reportaron que los hongos *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* son hongos fitopatógenos que producen cutinasas. En este estudio se obtuvieron 2 cepas que correspondieron a los géneros reportados previamente como productores de cutinasas y se observó que fueron capaces de desarrollarse en DEHF. El hongo que mejor se desarrolló en este ftalato fue *Aspergillus niger*. *Hypocrea lixii* es un hongo que no se ha reportado como productor de cutinasas. Se ha reportado que *Hypocrea lixii* pertenece al estado sexual de *Trichoderma harzianum* (Chaverri y cols. 2003). Este último hongo es importante en el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros y que tanto el estado asexual y sexual de esta

especiatieneampliadistribucióngeográfica. Esta relación entre estos dos hongos podría ser la causa por la ausencia del crecimiento de *Hypocrea lixii* en DEHF. Es importante mencionar que existen pocos reportes donde se han empleado cepas como las que se aislaron e identificaron en este trabajo, con la finalidad de degradar DEHF. Este es el primer estudio en el que se aíslan e identifican hongos presentes en una industria productora de papel capaces de degradar compuestos estructuralmente complejos como los ftalatos.

## 9. CONCLUSIONES

Se se obtubieron 49 ahisladode las que solo tres se les realizo estudios. Las tres cepas de hongos de la industria recicladora de papel, crecieron en presencia de DEHF, siendo las cepas *Neurospora* y *Aspergillus niger* las que mostraron mayor probabilidad de degradar al compuesto, ya que la densidad de biomasa se incremento al incrementarse la concentración del xenobiótico.

La cepa *Hypocrea lixii* mostró ser al menos tolerante a las concentraciones de DEHF empleadas en este estudio.

Los resultados sugieren que estos hongos utilizan DEHF como única fuente de carbono y energía, y, que podrían ser importantes en procesos de biorremediación de lugares contaminados por este tipo de compuestos.

## **10. PERSPECTIVAS**

Evaluar las enzimas que excretan los hongos en presencia de DEHF.

Cuantificar la degradación de DEHF después del crecimiento del hongo empleando técnicas cromatográficas.

Determinar los productos de degradación del DEHF después del crecimiento del hongo empleando cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas.

Evaluar la toxicidad antes y después del proceso de degradación.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn, S. H., Lee, J. H., Hong, Y. P., and Kim, M. K. 2004. Identification of the phthalate-degrading bacteria isolated from phthalate-contaminated soil and characterization of their phthalate substrate specificity. *B Environ Contam Tox.* 72: 911-915.
2. Arun, A., Praveen, R. P., Arthi, R., Ananthi, M., Sathish, K. K., and Eyini, M. 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Biodegradation by Basidiomycetes Fungi, *Pseudomonas* Isolate, and Their Cocultures: Comparative In Vivo and In Silico Approach. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151:132-142.
3. Benavides, L. M. M. J., Quintero, M. G., Guevara, V. A. L., Jaimes, C. D. C., Gutierrez, R. S. M., and Miranda, G. J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Publicacion Cientifica.* 4(5):82-90.
4. Bhattacharya, N., Dufour, J. M., Vo, M. N., Okita, J., Okita, R., And Kim, K. H., 2005. Differential effects of phthalates on the testis and the liver. *Biology of Reproduction.* 72: 745-754.
5. Bossche, V. H., 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev. Iberoam Micol.* 14: 44-49.
6. Cartwright, C. D., Owen, S. A., Thompson, I. P., and Richard, G. 2000. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiol Lett.* 186: 27-34.
7. Carvahalho C.M., Rocha A., M.L.F. Estevinho and Choupina., 2005. Identification of honey yeast species bases on RFLP analysis of the its region. *Ciencia y Tecnología Alimentaria.* 5(1):11-17.
8. CERHR. 2006. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, NTP-CERHR-DEHP-05. Available at <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/dehp/DEHP-Monograph>.
9. Chai, W., Suzuki, M., Handa, Y., Murakami, M., Utsukihara, T., Honma, Y., Nakajima, K., Saito, M., and Horiuchi, C-A., 2008. Biodegradation of Di-(2-ethylhexyl) phthalate by Fungi. *Rep. Nat'l. Food Res. Inst.* 72:83-87

10. Chandrasekaran, Y., Mckee, C., Ye, Yang., And Richburg. H. J., 2006. Influence of TRP53 status on FAS membrane localization, CFLAR (C-Flip) ubiquitinylation, and sensitivity of GC-2spd (ts) cells to undergo FAS-Mediate apoptosis. *Biology Of Reproduction*. 74:560-568.
11. Chang, B. V., Wang, T. H., and Yuan, S.Y. 2008. Biodegradation of four phthalate esters in sludge. *Chemosphere*. 69: 1116-1123.
12. Chaverri, P., Castlebury, L.A., Samuels, G.J. and Geiser, D M. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 302–313
13. Cosgrove, L., McGeechan, P. L., Robson, G. D., and Handley, P. S. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl Environ Microb*. 73:5817-5824.
14. Fernández Perrino, F. J. 1997. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el producto del último gen (*pen DE*) de la ruta de biosíntesis de penicilina. *Tesis doctoral*.
15. Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. 1999. Petroleum Biodegradation in Marine Environments. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol*. 1(1): 63-70.
16. Hauser R y Calafat A M. 2005. Phthalates And Human Health. *Occup Environ Med*. 62: 806–818.
17. Hwang., Soon-Seok., Choi, H-T., and Song, H-G., 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates by *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 18:767–772.
18. Kenneth, W., Cullings and Detlev, R. Vogler., 1998. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Molecular Ecology*. 7:919-923.
19. Kim, Y. H., and Lee, J. 2003. Degradation of an endocrine disrupting chemical DEHP [di-(ethyhexyl-phthalate)], by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 63:75-80.
20. Kim, Y. H., Seo, H. S., Min, J., Kim, Y. C., Ban, Y. H., Han, K. Y., Park, K. D., Bae, M. B., and Lee, J. 2007 Enhanced degradation and toxicity reduction of dihexyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase. *J Appl Microbiol*. 102:221-228.



21. Kim, Y-H., Lee, J., Ahn, J-Y., Gu, M. B., and Moon, S-H., 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate, *Fusarium oxisporum* f. pisi cutinase. *Appl Environ Microbiol.* 68: 4684-4688.
22. Kumar, J. R., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Manab, S. P., Bhattacharya, D. And Thakur, S. 2005. Microbial diversity: application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Microbial diversity.* 89(1):101-111
23. Kurahashi, N., Kondo, T., Omura. M., Umemura, t., Ma. M., and Kishi, R. 2005. The effects of subacute inhalation of Di (2-ethylhexyl) phthalato (DEHP) on the teste of prepubertal wistar rats. *J. Occup Health.* 47: 437-444.
24. Latini, G. 2005. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin Chem Acta.* 361:20-29.
25. Martín, M. C., González, B. A., And Blanco, S. M. J. 2004. Tratamientos Biológicos de suelo contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamiento de biorremediación. *Rev. Iberoam. Micol.* 21:103-120.
26. Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., and Rodríguez-Tudela, J. L. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Unidad de micología. Centro nacional de microbiología. Instituto de salud carlos III. 20:523-530.
27. Miura, Y., Naito, M., Ablake, M., Terayama, H., Shuang-Qin Y., Qu, N., Cheng1, L-X., Suna, S., Jitsunari, F., and Itoh, M. 2007. Short-term effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testes, liver, kidneys and pancreas in mice. *Asian J Androl.* 9 (2): 199-205.
28. Nalli, S., Cooper, D. G., and Nicell, J. A. 2002. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation.* 13:343-352.
29. Neelakanteshwar, K. P., Rajesh, K., Yogesh, S. S., and Karegoudar, T. B. 2006. Degradation of a plasticizer, di-n-butylphalate by *Delftia* sp. TBKNP-05. *Curr Microbiol.* 52:225-230.
30. Niazi, J. H., Prasad, D. T., and Karegoudar, T. B. 2000. Initial degradation of dimethylphthalate by esterases from *Bacillus* species. *FEMS Microbiol Lett.* 196:201-205.



31. Parks, I. G., Ostby, J. S., Lambright C. R., Abbott B. D., Klinefelter, N. J., Barlow, N. J., and Gray, L. N., 2000, The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sciences*. 58:339-349.
32. PIC, Phthalates Information Center. 2007. Research. Retrieved 26<sup>th</sup> April 2007 from <http://www.phthalates.org/resources/index.asp>.
33. Quan, C. S., Lui, Q., Tian, W. J., Kukichi, J., and Fan, S. D., 2004. Biodegradation of an andocrine. disrupting chemical, di-2ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* no.66. *Appl microbiology and biotechnology*. 66:702-710.
34. Reeslev M, and KjØller A. 1995. Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Appl Environ Microbiol* 61:4236–4239.
35. Rivera-Cruz, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Haller, V. V., Rodriguez, V, R., and Fernandez, L. L. 2002. Adaptacion Y Selección De Microorganismos Autoctonos en Medios de Cultivos Enriquecidos con Petroleo Crudo. *Terra*. 20:423-434.
36. Romero, M. C., Reinoso, E. H., Urrutia, M. I., and Moreno, K. A. 2006. Biosorption of heavy metals by *Talaromyces helicus*: a trained fungus for copper and biphenyl detoxification. *Electro. Journal of Biotech*. 9(3):221-226.
37. Sánchez, C., Ryder, R. A., Vilkiiji, Z., and Robson, G. 2009. Enrichment and identification of di (2-ethylhexyl) phthalate-degrading fungi from soil. (in press).
38. Tomita I, Nakamura Y, Yagi Y, Tutikawa K. 1986. Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. *Environ Health Perspect* 65:249–254.
39. Udeani, t. k. c., obroch, a. a., okwuosa. c. n., achukwu, p. u. and azubike, n. 2009. Isolation of bacterial from mechanic workshop` soil environment contaminated with used engine oil. *African journal of biotechnology*. 8(22):6301-6303.
40. Weeb, J. S., Nixon, M., Eastwood, A. M., Greenhalgh, M., Robson G. D., And Handley P. S. 2000. Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ. Microbiol*. 66:8:1394-3200.
41. Yarto, M., Gavilán, A., And Barrera, J. 2003. El Convenio de Estocolmo Sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes y sus Implicaciones para Mexico. *Gaceta*

Ecologica Instituto Nacional de Ecologia. 069:7-28.

42. Zeng, F., ui, k., li, x., fu, jiamo., and sheng, g., 2004. Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1. Process biochemistry. 39:1125-1129.