

DEGRADACIÓN DE ÁCIDO CIANÚRICO EMPLEANDO UN REACTOR DE LECHO EMPACADO Y UN CULTIVO BACTERIANO MIXTO

Silvia Patricia Galíndez Nájera¹, Marco Antonio Llamas Martínez¹, Deifilia Ahuatzí Chacón, Cleotilde Juárez Ramírez², Nora Ruiz Ordaz³ y Juvencio Galíndez Mayer³. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Prol. Carpio y Plan de Ayala S/N. Col. Plutarco Elías Calles. Del. Miguel Hidalgo, México, D.F. C.P 11340. Fax: (5) 729-6210.

cmayer@encb.ipn.mx

¹Becario PIFI-IPN; ²Becaria COFAA, EDD; ³Becarios COFAA, EDD y SIN

Palabras clave: ácido cianúrico, biodegradación, cianúrico hidrolasa

Introducción. El ácido cianúrico es un intermediario metabólico de la biodegradación de herbicidas triacínicos (atracina y simacina), cuya toxicidad y permanencia en el ambiente, ya demostradas [1], requieren de una solución urgente para evitar poner en peligro la biodiversidad. Varios microorganismos aislados de suelos contaminados son capaces de degradar estos herbicidas; sin embargo, algunos lo hacen de forma parcial con la consecuente acumulación del ácido cianúrico, que también representa cierto grado de toxicidad. La cianúrico hidrolasa es la primera enzima de la ruta de degradación del compuesto. En este trabajo se evaluó la eficiencia de degradación del ácido cianúrico en un reactor de lecho empacado con roca volcánica inoculado con un cultivo mixto de bacterias.

Metodología. Microorganismos: a partir de suelos agrícolas se aislaron dos cepas bacterianas capaces de degradar el ácido cianúrico. Una de ellas fue previamente identificada como *Agrobacterium tumefaciens* [2], y la otra se identificó recientemente, por secuenciación del 16S rDNA. En ambas cepas se evaluó la actividad de la cianúrico hidrolasa mediante un ensayo espectrofotométrico que se basa en la desaparición del sustrato (ácido cianúrico), cuyo máximo de absorción se ubica en 220nm [3]. La actividad enzimática se determinó en extractos libres de células (rompimiento mecánico) de muestras procedentes de cultivos por lote donde se adicionó glucosa como fuente de carbono complementaria. Biorreactor: se utilizó un reactor de dos etapas separadas físicamente por una placa de vidrio poroso. En cada etapa de 550mL se colocaron fragmentos de roca volcánica (tezontle) con tamaño de 5 a 8mm. El aire y el medio de cultivo se suministraron en la parte inferior del reactor; el primero a través de una placa de vidrio poroso. El proceso de degradación se llevó a cabo en forma continua con una velocidad de dilución de $0.072d^{-1}$, y medio mínimo mineral adicionado con el ácido cianúrico con una concentración de 50ppm. Este fue la única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Biodegradación: inicialmente se trabajó en condiciones abióticas (testigo abiótico) hasta que la concentración del ácido cianúrico a la salida del reactor se igualó a la de la entrada. Posteriormente se inoculó el reactor con las dos bacterias previamente cultivadas en el mismo medio de cultivo (medio mínimo mineral + ácido cianúrico) y se mantuvo el suministro continuo por varios meses. Durante todo el proceso se tomaron muestras del efluente del reactor y se determinó la concentración de ácido cianúrico (espectrofotométricamente por el método 18SI-OZ de Hach), y la concentración celular (UFC/mL en agar cuenta

estándar). Además se extrajo el DNA del paquete celular, se purificó, se amplificó por PCR y se sometió a electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE), con la finalidad de observar la permanencia de las dos cepas inoculadas.

Resultados y Discusión. Por secuenciación y comparación con el banco de genes de NCBI se identificó a la segunda cepa aislada como *Acinetobacter sp.*(1) con un 96% de homología con clave de acceso AF467306. Las dos cepas muestran actividad de la cianúrico hidrolasa, donde la cepa de *Acinetobacter sp.* mostró un nivel ligeramente superior a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*(2). Después de un mes de operación del reactor se alcanzó una eficiencia de remoción del ácido cianúrico de 95% y una velocidad volumétrica de 3.44 mg/Ld los que permanecen constantes después de 4 meses. También el número de UFC/mL se mantuvo constante y próximo a 3×10^6 UFC/mL. Por otro lado como el reactor no se trabajó en condiciones asépticas, en las placas de agar cuenta estándar se manifestaron tres morfologías distintas (recordando que al inicio se inocularon dos cepas), lo que se comprobó en la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE). En la Fig. 1 se observan las bandas (1) y (2) correspondientes a las dos cepas previamente identificadas, y (3) es la banda correspondiente a una tercera cepa aún no identificada.



Fig. 1. Electroforesis con gradiente de temperatura de un fragmento del 16S rDNA del paquete celular obtenido del efluente del reactor

Conclusiones. El reactor de lecho empacado presenta una alta eficiencia de degradación (95%). Se aisló una tercera cepa del efluente del reactor cuya función en el mismo será definida posteriormente.

Agradecimiento. SIP, COFAA y PIFI del Instituto Politécnico Nacional, por los apoyos económicos brindados para la realización de este trabajo.

Bibliografía.

- European Comisión. (2003). Health a consumer Protection Directorate-General Simazine. SANCO/10495/2003-rev. final. Review report for the active substance simazine.
- Galíndez, S. (2006). Aislamiento de microorganismos capaces de degradar ácido cianúrico. *IV Congreso Internacional y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*. Colegio mexicano de Ingenieros Bioquímicos, Morelia, Mich., del 4 al 7 de abril, 3-5.
- Karns, J.(1999). Gwnw Sequence and Properties of fan s-Triazine Ring-Cleavage Enzyme from *Pseudomonas sp.* Strain NRRLB-12227. *Appl. Environ. Microbiol.* vol.65(8):3512-3517.