

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS TOLERANTES A ACEITES DIELECTRICOS USADOS Y LOS BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs) DE SUELOS CONTAMINADOS*

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FILAMENTOUS FUNGI TOLERANT TO USED DIELECTRIC OILS AND CONTAMINATED SOIL POLYCHLORINATED BIPHENYLS PCBs

Aracely García Cuán¹
Ana Medina Buelvas²
Juan Felipe Lara Cobos³

Universidad Libre Seccional Barranquilla

DOI: <https://doi.org/10.18041/2390-0512/bioc..1.2431>

RESUMEN

Los PCBs por sus propiedades físicas y químicas son usados en diferentes sectores industriales; sus productos de desechos y su almacenamiento inadecuado han contaminado ambientes como suelos y aguas poniendo en peligro la supervivencia en los ecosistemas. Sin embargo, algunos seres vivos son capaces de adaptarse. Los bifenilos policlorados (PCBs) son compuestos orgánicos de hidrocarburos sintéticos formados por dos anillos de benceno unidos por un enlace de carbono; comprenden una clase de 209 compuestos individuales, isómeros y congéneres. Su objetivo fue aislar e identificar hongos filamentosos capaces de tolerar y adaptarse para sobrevivir en condiciones adversas en el ecosistema suelo contaminado por el xenobiótico PCBs, presente en aceites dieléctricos usados (ADU) en un sector industrial de Barranquilla. Los hongos aislados de los géneros *Aspergillus* sp, *Alternaria* sp, *Phoma* sp, *Rhizopus* sp. sobrevivieron a concentraciones de ADU 20 %, y a 200 ppm de PCBs.

Palabras clave: Aceites dieléctricos usados, Supervivencia fúngica, Bifenilos policlorados, PCBs.

ABSTRACT

PCBs for their physical and chemical properties are used in different industrial sectors; waste products and inadequate storage have polluted environments such as soils and water that endanger ecosystem survival. However, some living beings are able to adapt. Polychlorinated biphenyls (PCBs) are organic synthetic hydrocarbon compounds formed by two benzene rings bonded by a carbon bond, comprise a class of 209 individual compounds, isomers and congeners. Its objective was the isolation and identification of filamentous fungi capable of tolerating and adapting to survive in adverse conditions in the soil ecosystem contaminated by the xenobiotic PCBs, present in used dielectric oils (ADU) in an industrial sector of Barranquilla. The isolated fungi of the genus *Aspergillus* sp, *Alternaria* sp, *Phoma* sp, *Rhizopus* sp. survived concentrations of 20% ADU, and 200 ppm of PCBs.

Keywords: Dielectric oils used, Fungal survival, Polychlorinated biphenyls, PCBs.

Recibido: 16/01/2017

Aceptado: 19/03/2017



* Este trabajo descriptivo forma parte de un macroproyecto de biorremediación que viene ejecutando el grupo de investigación IMB de la Universidad Libre seccional Barranquilla.

1. MSc. en Biología Molecular y Biotecnología. Docente Investigadora, Grupo IMB Programa Medicina Universidad Libre seccional Barranquilla. aracely.garcia@unilibre.edu.co
2. MSc. en Microbiología Industrial. Docente Investigadora, Grupo IMB Programa Medicina Universidad Libre seccional Barranquilla. anam.medinab@unilibre.edu.co
3. Compilador trabajos realizados por estudiantes del programa de Microbiología. Investigador Grupo IMB Programa Medicina Universidad Libre seccional Barranquilla. juan.cobos05@gmail.com

Cómo citar este artículo:

García Cuan A, Medina Buelvas A, Lara Cobos J. Aislamiento e Identificación de Hongos filamentosos tolerantes a aceites dieléctricos usados y los Bifenilos Policlorados (PCBs) de suelos contaminados. *Biociencias* [Internet]. 5ene.2017 [citado diames.año]; 12(1): 25-30. Available from: <http://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/2431>

INTRODUCCIÓN

Los bifenilos policlorados son compuestos orgánicos de hidrocarburos sintéticos formados por dos anillos de benceno unidos por un enlace de carbono, comprenden una clase de 209 compuestos individuales, isómeros y congéneres (1). Se encuentran clasificados como uno de los 12 compuestos orgánicos persistentes (2), por su capacidad de bioacumularse en las cadenas tróficas, ser resistentes a procesos de degradación, presentar alta toxicidad y producir daños en el ambiente y a los organismos expuestos a estos, debido a su alta estabilidad química, física y biológica (3).

Estos se utilizaban principalmente en equipos eléctricos de alta tensión fundamentalmente como lubricantes, recubrimientos y aislantes en transformadores y condensadores.

Los aceites dieléctricos (ADU's) son una mezcla de hidrocarburos nafténicos, isoparafínicos y aromáticos, cuya composición varía de acuerdo con el crudo del que se destilan y del método de refinación empleado (4), al igual que los PCBs presentan excelente estabilidad, la contaminación cruzada con PCBs inicia al reutilizarse los equipos viejos contaminados con PCBs o en sus procesos de mantenimientos.

El gobierno colombiano inició la lucha contra esta problemática mediante la Convención de Basilea (marzo de 1989) (5), de la cual Colombia ha formado parte desde 1996 (Ley 253 de la República, enero 9 de 1996), la firma del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes en el año 2001, posteriormente, la Ley 1196 de 2008 aprueba el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) (6), estableciendo que el país tiene la obligación de eliminar el

uso de los equipos contaminados con PCBs antes de finalizar el año 2025 y realizar esfuerzos destinados a lograr una gestión ambientalmente adecuada de los desechos y equipos contaminados con PCBs a más tardar en el 2028 (7).

El objetivo del trabajo fue aislar e identificar hongos filamentosos autóctonos de suelos contaminados con aceites dieléctricos (ADU) y PCBs y evaluar su capacidad de tolerancia a diferentes concentraciones de estos compuestos policlorados y recalci-trantes.

Por otro lado, es un estudio preliminar para futuras investigaciones que tengan como objetivo potencializar el uso de cepas microbianas en procesos de biorremediación, tales como bioaumentación y bioestimulación.

A diferencia de los métodos físicos: Incineración; métodos biológicos: Biodegradación; y generalmente pocos rentables, los métodos químicos: cloración, entre otros (8), utilizados para la eliminación de los PCBs, es importante resaltar el desarrollo de tecnologías económicas como la biorremediación, puesto que, varios estudios han descrito el uso de consorcios microbianos para la biodegradación de estos bifenilos policlorados (9), donde hongos implicados en el proceso de degradación aeróbica producen exoenzimas oxidativas no específicas, entre las que han logrado ser identificadas hasta el momento: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasas, estas han sido descritas en la degradación de numerosos contaminantes orgánicos (10-12).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo de suelos contaminados

Se realizaron dos tipos de muestreos, puntuales y

al azar, a una profundidad no mayor de 20 cm, el primer muestreo comprendió 4 zonas en el predio comercial situado entre la carrera 45 con calle 4 y el segundo muestreo fue al azar en 5 zonas de suelos contaminados en un sector comprendido entre la calle 17 y la calle 30 con carrera 38 en la ciudad de Barranquilla-Colombia.

Aislamiento de microorganismos endógenos de suelos contaminados con aceites dieléctricos usados y PCBs

Se empleó la técnica de dilución sucesiva inoculando 1 gr de cada muestra en agua peptonada al 1 % hasta llegar al factor de dilución 10^{-3} . Se sembró mediante técnica en superficie 0,1 ml en cajas de agar Sabouraud (Merck) y agar YGC suplementado con antibiótico (agar extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol, Merck). Se incubaron a temperatura ambiente durante 72 horas.

Aislamiento selectivo de microorganismos endógenos de suelos contaminados con aceites dieléctricos usados y PCBs

Se prepararon los siguientes medios selectivos, los cuales fueron inoculados con un pull formado por las muestras provenientes del muestreo al azar, estas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 72 horas.

Medio mineral: $MgSO_4$ (19,5gr/L), $FeSO_4$ (1gr/L), $CaCl_2$ (0,3gr/L)

Medio número 1: agar agar 12gr + medio mineral 9ml + aceite dieléctrico 9ml + tritón x-100 (1250 landas).

Medio número 2: agar agar 12gr + medio mineral 9ml + aceite dieléctrico 9ml + extracto de levadura 48gr + tritón x-100 (1250 landas).

Aislamiento selectivo de microorganismos tolerantes a PCBs

Se preparó medio selectivo PAS (fosfato-amonio y sales minerales) suplementado con PCBs, con la siguiente composición grs/L: K_2HPO_4 (56,77 grs), NH_4Cl (27,61 grs), Aroclor 1260 (125ppm), el cual fue inoculado con 22 grs de pool formado de las muestras provenientes del muestreo puntual, esto se incubó a temperatura ambiente en shaker a 150 rpm por 15 días, una vez finalizado el periodo de incubación se inocularon cajas de petri con agar Sabouraud y sales minerales.

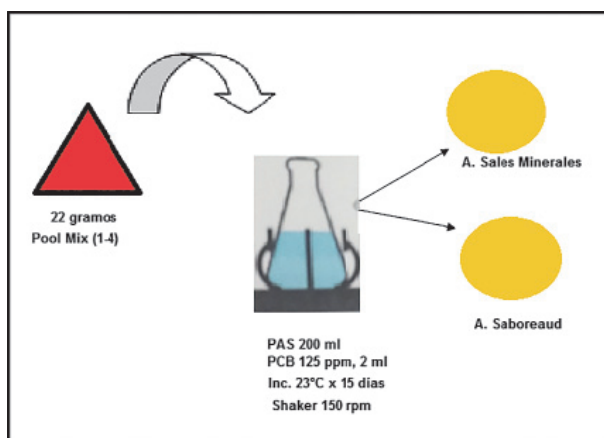


Figura 1. Aislamiento de hongos tolerantes a PCBs en medios enriquecidos, agar Sabouraud y sales minerales

Obtención de biomasa fúngica

Se inoculó cada hongo aislado anteriormente en 100 mL de caldo extracto de malta (Merck), contenidos en un erlenmeyer de 250 mL. Se incubó a temperatura ambiente ($25^{\circ}C-30^{\circ}C$) en shaker a (90 rpm) durante 10 días, pasado el periodo de incubación se obtuvo la biomasa por medio de filtración y lavado mediante papel filtro y agua destilada estéril.

Ensayo de supervivencia a PCBs

Se tomó 0,5 g de biomasa axénica proveniente de los cultivos anteriores y se inoculó en 5 ml de caldo extracto de malta suplementado con Aroclor 1260

a concentraciones de 50 ppm, 100 ppm y 0,22 g en 200 ppm, la incubación se realizó a temperatura ambiente 25°C-30°C en shaker a 60 rpm durante 10 días.

Los ensayos se realizaron por triplicado incluyéndose los controles de calidad de medio.

Posteriormente se realizó siembra en agar Sabouraud (Merck) incubándose a temperatura ambiente durante 96 horas.

Ensayo de tolerancia a ADU

Se preparó agar Sabouraud (Merck) suplementado con ADU a una concentración del 20 % total del volumen preparado de agar Sabouraud (Merck) con tritón x-100 (1250 landas) y un pH final de 6,0, se transfirieron 0,5 cm² de agar invadido con los hongos tolerantes obtenidos en los aislamientos anteriores, estos se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas.

Identificación

Las colonias obtenidas son repicadas y aisladas en agar Sabouraud (Merck) hasta obtener cultivos axénicos, se hacen frotis de los cultivos en placa y se tiñen con azul de lactofenol para posterior observación de estructuras en microscopía óptica.

El análisis macroscópico comprende: textura y color de la colonia, presencia de surcos, exudado, producción de pigmento. Microscópico: presencia de septos, tamaño de la hifa y sus estructuras de reproducción.

RESULTADOS

Aislamiento selectivo de microorganismos tolerantes a PCBs

Los hongos tolerantes a PCBs que lograron aislarse e identificarse del medio de cultivo PAS fueron:

Alternaria sp.

Phoma sp.

Aspergillus sp.

Aspergillus niger

Aspergillus flavus

Aspergillus terreus

Aislamiento selectivo de microorganismos endógenos de suelos contaminados con aceites dieléctricos usados contaminados con PCBs

Los hongos tolerantes a aceites dieléctricos usados contaminados con PCBs que lograron aislarse e identificarse en los medios selectivos fueron:

Tabla 1. Hongos endógenos tolerantes a aceite dieléctrico y PCBs aislados e identificados de suelos contaminados en zona de Barranquillita

Medio de cultivo	Hongos tolerantes a ADU y PCBs
Número 1	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Rhizopus sp.</i>
Número 2	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus fumigatum</i> <i>Aspergillus terreus</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Penicilium sp.</i>

Ensayo de tolerancia a los ADU y PCBs

Una vez terminado el periodo de incubación de los hongos aislados del medio PAS, estos no presentaron un óptimo desarrollo radial micelial, por lo que el tiempo de incubación se extendió por 30 días más, sin observar cambios significativos al finalizar.

De los 10 hongos que crecieron en los medios selectivos y fueron sometidos al ensayo de tolerancia, el *Aspergillus niger* fue el de mayor crecimiento micelial seguido de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Alternaria sp*, *Phoma sp*, *Rhizopus sp*. El crecimiento de estos hongos se afectó considerablemente cuando se sometieron a medios selectivos utilizados y a los ensayos de tolerancia descritos.

DISCUSIÓN

La mayoría de los hongos nativos, aislados e identificados de las muestras de suelo contaminado con aceite dieléctrico y PCBs pertenecen al género *Aspergillus*, los cuales son reconocidos por ser hongos que crecen en medios contaminados por hidrocarburos (hidrocarbonoclastas) (13) y se caracterizan por presentar un sistema enzimático bastante diverso, poseen complejos oxidativos, lipolíticos, biosurfactantes y son hongos aerobios estrictos, cuya degradación puede esquematizarse:



Vásquez y cols, 2010, en un estudio evaluando consorcios microbianos nativos para el tratamiento primario de lodos provenientes de lavaderos de carros (contaminados con aceites lubricantes de motor) y de alcantarillado de la zona industrial de Bucaramanga (Dpto. Santander-Colombia) inocularon una concentración de 3×10^8 ufc/ml de bacterias y microorganismos fúngicos como *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, a una concentración de 1×10^6 esporas/ml y obtuvieron porcentajes de remoción hasta de 94 % de HTP (hidrocarburos totales de petróleo) en 120 días y 84 % en 40 días (14). Por lo anterior, se deduce que las cepas de hongos identificadas nativas del suelo contaminado con ADU usado y PCBs en la zona de Barranquilla, lograron resistir el cambio en su ambiente.

La presencia de contaminación con PCBs puede ser tratada por biorremediación, la cual representa una gran alternativa por su bajo costo. El avance y desarrollo de tecnologías de biorremediación depende mayormente de la disponibilidad de cepas autóctonas de compuestos xenobióticos o sitios contaminados. Varios estudios han demostrado la capacidad degradadora de especies de macromicetos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Lentinus*

sp., *Pleurotus sp.*, *Trametes versicolor* (15-18) y hongos filamentosos aislados de suelos contaminados como *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Phoma sp.* (9,16) frente a compuestos organoclorados persistentes (COPs).

CONCLUSIONES

Los hongos aislados se identificaron como: *Alternaria sp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.*, *Phoma sp.*

Los hongos sobrevivieron a concentraciones del 20 % de ADU's y 200 ppm de PCBs en medios enriquecidos.

Los reportes demuestran el potencial uso de la microflora autóctona en procesos de biorremediación y degradación de PCBs.

AGRADECIMIENTOS

A los estudiantes del Pregrado del Programa de Microbiología de la Universidad Libre de Barranquilla: Oscar Márquez Avendaño, Linda Luz Mora Cera, Etel Castro Orozco, María Angélica Arroyo, Tatiana Arrieta Melgarejo, Jessica Páez Reales, Ibón Jiménez Arias, Dayana Altafulla Pacheco, Lorena Osorio, Rafael Tocora, María de los Ángeles Cepeda, Luzdary Barrios, Haylen Cotes, Wendy Quintero, Lidia Siado D. Por la colaboración y apoyo durante el trabajo de campo y ensayos de laboratorio realizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gobierno de Chile (Comisión Nacional del Medio Ambiente). Manual de Chile sobre el manejo de Bifenilos Policlorados (PCBs; Askareles). Estudio de caso sobre la aplicación de guías; 2004.
2. Ministerio del Ambiente. Línea base de los

- contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en la matriz aire del Ecuador; 2012.
3. Rodríguez A. Estudio de procesos químicos para la eliminación de compuestos bifenilos policlorados (PCBs); 2015.
 4. Brettis. Módulo 8: Transformadores [Internet]. 2013. p. Módulo 8. Disponible en: <http://www.brettis.com/Tutorial/08Transformadores.pdf>
 5. Convenio Basilea. Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación; 2014. p. 1-30.
 6. Republica de Colombia. Plan Nacional de contaminantes orgánicos persistentes-COP; 2010.
 7. Festus Anasonye. Treatment of organic aromatic contaminants in soil with fungi and biochar; 2017.
 8. Ministerio del Medio Ambiente. Manual de manejo de PCBs para Colombia. 1999;1-137. Disponible en: http://www.crc.gov.co/files/Respel/Manual_PCBs.pdf
 9. Mouhamadou B, Faure M, Sage L, Marçais J, Souard F, Geremia R. Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fungal Biol.* 2013;117(4):268-74.
 10. Dávila G, Vázquez R. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico* [Internet]. 2006;29-55. Disponible en: <http://bq.unam.mx/mensajebioquimicoUTH>
 11. Hughes KA, Bridge P, Clark MS. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Sci Total Environ.* 2007;372(2-3):539-48.
 12. García A, Medina A, Rosado P, Peña M, Rosales N, Ortiz M. Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by Native Microbial Consortium in Contaminated Dielectric Oils: A Regression Analysis. *International Journal of Control Theory and Applications.* International Science Press. 2016;9(44):483-490.
 13. April TM, Foght M and Currah R. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal Microbiology.* 2000;46:38-49.
 14. Vásquez MC, Guerrero Figueroa JT, Del Pilar Quintero A. Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana Biotecnológica.* 2010;12(1): 141-157.
 15. Dietrich D, Hickey WJ, Lamar R. Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1995 Nov 1;61(11):3904-9. Available from: <http://aem.asm.org/content/61/11/3904.abstract>
 16. Ruiz G, Fernández J, Rodríguez R, Poggi H. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCBs extracted from a contaminated soil. *Adv Environ Res.* 2002;6(4):559-68.
 17. Čvančarová M, Křesinová Z, Filipová A, Covino S, Cajthaml T. Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere.* 2012;88(11):1317-23.
 18. Qin H, Brookes PC, Xu J. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae alter soil bacterial community and enhance polychlorinated biphenyls dissipation. *Front Microbiol.* 2016;7(jun):1-10.