



BIODEGRADACION DE TOXAFENO POR HONGOS DE LA PUDRICIÓN BLANCA

Jorge Luna Fontalvo ¹ ✉, Sandra Vera ²

1.Universidad del
Magdalena – Santa
Marta, Colombia.
jorgealbertolunafon
talvo@yahoo.es;
2.Universidad del
Magdalena – Santa
Marta, Colombia.

Palabras clave:
toxafeno, hongos
de la podredumbre
blanca,
biorremediación.

RESUMEN

El toxafeno es un plaguicida conformado por más de 200 moléculas policloradas que presenta gran estabilidad físico-química y alta persistencia en el ambiente. La Convención de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en el 2001 incluyó al toxafeno dentro del listado de 12 compuestos denominados como la “docena sucia” debido a su toxicidad para el medio ambiente y salud humana. La biodegradación de estos compuestos químicos altamente complejos puede lograrse por medio del uso de microorganismos. Los Hongos de la Podredumbre Blanca (HPB) son basidiomicetos con gran potencial enzimático en procesos de biorremediación, poseen capacidad para degradar la lignina y otras moléculas recalcitrantes. En este trabajo utilizamos dos cepas de HPB, en un sistema de bioaumentación para biodegradar el toxafeno presente en el suelo. El sistema de bioaumentación estuvo conformado por mezclas de suelo contaminado con aserrín y cascarilla de arroz inoculados con *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* en proporciones p/p (1/1) durante cinco meses. La extracción de toxafeno del suelo se realizó a través de digestión con solventes y sonicación y la cuantificación por cromatografía de gases. Los resultados muestran que los hongos presentan capacidad para biodegradar toxafeno especialmente si actúan sinérgicamente sobre el sustrato de cascarilla de arroz y aserrín/cascarilla de arroz donde se observó un 90% de degradación del toxafeno. Este estudio demuestra que estas especies de macromicetos tienen la capacidad de biodegradar toxafeno, degradación que probablemente se deba a procesos enzimáticos en el que participan la lacasa, LiP y MnP.

BIODEGRADATION OF TOXAPHENE BY WHITE ROT FUNGI**Keywords:**

toxaphene,
white rot fungi,
bioremediation.

**SUELOS
ECUATORIAL
ES**
47(1 y 2):72-77p
ISSN 0562-5351

ABSTRACT

Toxaphene is a pesticide comprising more than 200 polychlorinated molecules having great physical-chemical stability and high persistence in the environment. The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) in 2001 included toxaphene in the list of 12 compounds known as the “dirty dozen” because of its toxicity to the environment and human health. The biodegradation of these highly complex chemical compounds can be achieved by the use of microorganisms. The White Rot Fungus (WRF) are Basidiomycetes with great enzyme potential in bioremediation processes have the capacity to degrade lignin and other recalcitrant molecules. In this paper we use two strains of WRF, in a system bioaugmentation to biodegrade the toxaphene in the soil. Bioaugmentation system consisted of mixtures of soil contaminated with sawdust and rice husks inoculated with *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* in ratios p / p (1/1) for five months. Extraction was performed toxaphene soil through digestion and sonication solvents and quantification by gas chromatography. The results show that fungi have ability to biodegrade toxaphene with act synergistically on the substrate of sawdust rice and husk / rice husk with 90% degradation. This study demonstrates that these species macromycetes are capable biodegrade toxaphene, degradation that probably due to enzymatic processes in which the laccase, LiP MnP and participate.

Rec.: 11.07.2016

Acep.: 18.11.2016

INTRODUCCIÓN

Mundialmente se estima que se utilizaron 1'330.000 toneladas de toxafeno como pesticida entre 1950 y 1993 en cultivos de algodón y soja principalmente (Kucklick y Helm, 2006). La aplicación de pesticidas aumentaron la productividad agrícola, pero generaron impactos negativos para el ambiente y la salud humana (Bovet, 2008). El toxafeno es un compuesto tóxico, potencialmente carcinógeno, que puede causar daños neurológicos y defectos congénitos (Environmental Protection Agency, 2010). Posee un elevado grado de halogenación que permite su solubilidad en lípidos y difundirse a través de membranas biológicas (Purnomo et al. 2008), por lo que ha sido detectado en la carne, huevos, leche materna (Vallack et al. 1988) y dentro de la red trófica en distintas especies de peces (Oetjen et al. 1998) entre otros.

Debido a sus efectos tóxicos fue prohibido durante la década de los 80 (Voldner y Li, 1993). Con la prohibición de toxafeno y de otros compuestos xenobióticos en el país se generaron grandes cantidades de pesticidas obsoletos que se almacenaron sin cumplir con las normas de manejo integral de sustancias tóxicas. Como consecuencia, en 1996 en el corregimiento de Caracolicito (Copey) 153 tambores de toxafeno fueron almacenados en las bodegas de Cenalgodón sin ningún tipo de protección al medio ambiente (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 1997), que ocasionó la contaminación de 4913,8 m² de suelo con toxafeno (Facultad de Agronomía - Universidad Nacional de Colombia, 2010).

El área afectada se encuentra a las afueras del corregimiento de Caracolicito y representa un riesgo para la salud de las poblaciones humanas cercanas, ya que en temporadas de lluvia la contaminación puede extenderse a otras fuentes de agua por medio de escorrentías. El problema de contaminación ambiental es grave, debido a que el toxafeno posee diversas propiedades químicas (estabilidad, gran tamaño molecular, alto número de cloros, poca solubilidad en agua y fuerte adsorción al suelo) (Luo

et al. 2015), que limitan su biodegradación (Arbeli, 2009). Sin embargo, técnicas como la biorremediación pueden descontaminar el ambiente por medio de microorganismos con capacidad de degradar compuestos químicos altamente complejos (Alexander, 1999). Los hongos de la podredumbre blanca tienen la capacidad de usar los contaminantes organoclorados como fuente de carbono y crecer en sustratos lignocelulíticos de muy bajo costo que promueven su crecimiento e incrementan la degradación del contaminante (Aust y Benson, 1993).

Debido al limitado conocimiento en la biodegradación de toxafeno por medio de hongos. Este trabajo pretende evaluar la biodegradación del toxafeno presente en el suelo de las bodegas de Cenalgodón (Caracolicito, Cesar) utilizando cepas de los hongos ligno-celulolíticos *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* a través de un proceso de biorremediación por bioaumentación en condiciones de laboratorio; y con esta técnica de biotratamiento proponer nuevas alternativas en la recuperación del suelo contaminado.

METODOLOGÍA

Obtención de las muestras de suelo

Las muestras de suelo se tomaron teniendo en cuenta las manchas de color café causadas por toxafeno en las antiguas bodegas de Cenalgodón (Copey). El suelo fue depositado en bolsas ziploc de 1 kg de capacidad con cierre hermético, debidamente rotuladas. Y trasladadas hasta el Laboratorio de Calidad de Agua de la Universidad del Magdalena. El suelo fue tamizado con el fin de obtener un tamaño máximo de partícula de 2 mm y separarlo de otros restos.

Ensayos de Biodegradación de toxafeno a través de Bioaumentación

Siembra de *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* en los sustratos de aserrín y cascarilla de arroz

A partir del sustrato de arroz inoculado con los hongos, se depositaron 50 g de éstos en las bolsas que contenían cascarilla de arroz y aserrín, distribuyéndolos de manera homogénea en la superficie de cada una. Las bolsas se incubaron a 22 ± 2 ° C por 20 días hasta que se observó la colonización de los sustratos por un micelio blanco.

Establecimiento de los ensayos de biodegradación del toxafeno a partir sustratos inoculados con hongos ligno-celulolíticos

Luego del periodo de incubación (20 días) de las bolsas con los sustratos inoculados con *P. ostreatus* y *G. lucidum*, se realizaron diferentes mezclas de suelo con los sustratos (tabla 1) por triplicado, tomando 500 g de suelo contaminado y 500 g del inoculo en aserrín y en cascarilla de arroz (relación 1/1). Las diferentes mezclas se colocaron en bandejas plásticas cerradas debidamente en condiciones aeróbicas. Los ensayos se mantuvieron a temperatura ambiente (25°C – 27°C), e hidratados con agua destilada agregando 20 mL por bandeja cada 3 días, removiendo las mezclas en cada hidratación según el criterio del investigador.

Tabla 1. Tratamientos de biodegradación del toxafeno presente en el suelo por medio de bioaumentación.

Sustratos	Siglas	Tratamientos
Controles	ST	Suelo contaminado con toxafeno
	STA	Suelo contaminado con toxafeno + Aserrín sin inocular
	STC	Suelo contaminado con toxafeno + Cascarilla de arroz sin inocular
Grupo 1 Suelo + Aserrín	STAP	Suelo contaminado con toxafeno + Aserrín inoculado con <i>P. ostreatus</i>
	STAG	Suelo contaminado con toxafeno + Aserrín inoculado con <i>G. lucidum</i>
	STAPG	Suelo contaminado con toxafeno + Aserrín inoculado con <i>P. ostreatus</i> + Aserrín inoculado con <i>G. lucidum</i>
Grupo 2 Suelo + Cascarilla de arroz	STCP	Suelo contaminado con toxafeno + Cascarilla de arroz inoculado con <i>P. ostreatus</i>
	STCG	Suelo contaminado con toxafeno + Cascarilla de arroz inoculado con <i>G. lucidum</i> .
	STCPG	Suelo contaminado con toxafeno + Cascarilla de arroz inoculado con <i>P. ostreatus</i> + Cascarilla de arroz inoculado con <i>G. lucidum</i> .
Grupo 3 Suelo + Aserrín + Cascarilla de arroz	STAPAGPCPG	Suelo contaminado con toxafeno + Aserrín inoculado con <i>P. ostreatus</i> + Aserrín inoculado con <i>G. lucidum</i> + Cascarilla de arroz inoculado con <i>P. ostreatus</i> + Cascarilla de arroz inoculado con <i>G. lucidum</i>

Extracción y cuantificación de toxafeno a partir de suelo

De cada unidad experimental se pesaron 5 g de suelo previamente secado al aire y luego fue depositado en tubos de vidrio con tapa rosca de 20 mL, se agregó 5 g de sulfato de sodio y 10 mL de isoocano, las muestras se agitaron vigorosamente y se sometieron a baño de ultrasonido con sonicador marca Branson modelo 3510 por 18 horas. Finalizado el tiempo de las muestras en el ultrasonido, se tomó el solvente con jeringa y aguja, luego se filtró el solvente con filtro de nylon (Sartorius NY 0.20 µm) previamente instalado en la jeringa. Las primeras 5 gotas del

filtrado se descartaron y el restante se depositó en un vial de cromatografía.

La cuantificación de toxafeno se realizó con un cromatógrafo de gases marca Shimadzu GC-2014, equipado con automuestreador AOC-20s, autoinyector AOC-20is, columna DB-XLD (30 metros por 0.25 mm diámetro interno, 0.25 µm de espesor) y detector FID. Se utilizó helio como gas de arrastre y nitrógeno como gas make up, temperatura a 220°C en el puerto de inyección y la temperatura de la columna programada a 170°C (2 min) aumentando 7°C/min hasta 210°C (0 min), 4°C/min hasta 250°C (0 min) y 2°C/min hasta

280°C manteniéndose por 7 minutos, la temperatura del detector a 300°C. Modo de inyección Split, inyectando 1.0 µl de muestra.

La curva de calibración se realizó con ocho concentraciones (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 mg*L⁻¹) por triplicado, es decir, tres inyecciones por concentración y coeficiente de determinación (r^2 : 0.9948). Los cromatogramas de los patrones de toxafeno se integraron por picos, con tiempos de retención de: 14.056 min, 15.956 min, 19.973 min, 20.075 min, 21.781 min y 23.717 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la degradación de toxafeno. Los controles de suelo contaminado/Aserrín y de suelo contaminado/cascarilla de arroz presentan menores concentraciones de toxafeno en comparación al suelo contaminado/sin sustrato, lo que sugiere que los sustratos pudieron estimular el crecimiento de las poblaciones microbianas nativas del suelo con la capacidad de degradar el plaguicida (Fig. 1a). Sin embargo, en los tratamientos de bioaumentación se logró remover el 90% de toxafeno a partir de los 30 días en los sustratos de Cascarilla de arroz y de Aserrín/Cascarilla de arroz con la acción sinérgica de *P. ostreatus* y *G. lucidum* (Fig.1c; 1d).

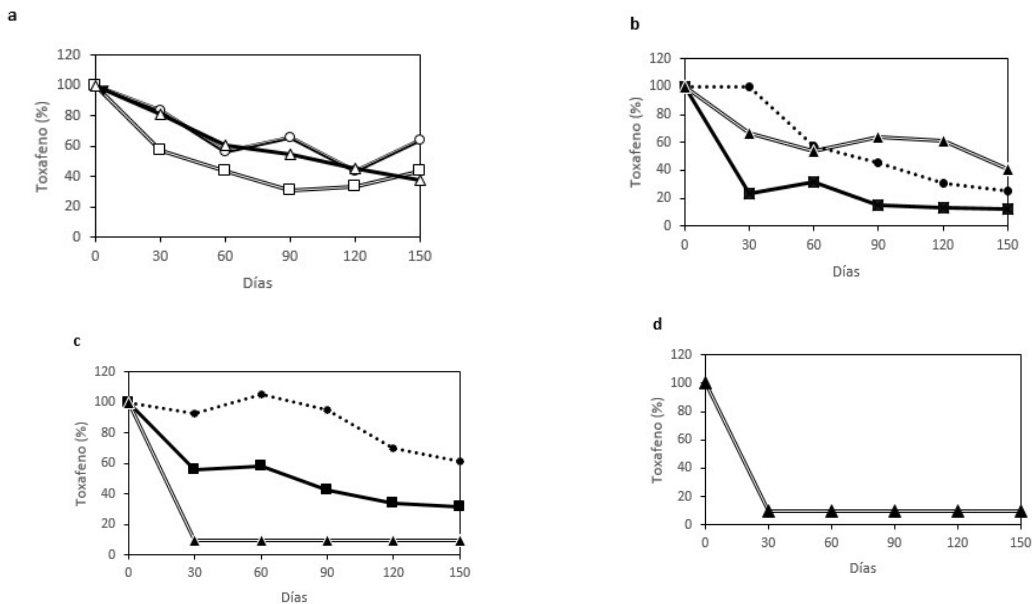


Figura 1. Evolución temporal de la concentración de toxafeno en los ensayos: **a.** Controles. Suelo contaminado/sin sustrato representado por círculo; Suelo contaminado/Aserrín por cuadrado; Suelo contaminado/Cascarilla arroz por triángulo. **b.** Tratamientos inoculados con hongos en Aserrín, **c.** Cascarilla de Arroz, **d.** Aserrín/Cascarilla de arroz. Los hongos representados así: *P. ostreatus* por línea punteada círculo negro; *G. lucidum* por línea solida cuadrado negro; *P. ostreatus/G. lucidum* por doble línea triángulo.

El trabajo de Lacayo et al. (2006) con *Berjerkandera adusta* expone un 85%, 52% y 49% de degradación de toxafeno en los sustratos de cascara de trigo, virutas de madera y melaza respectivamente. En

nuestro estudio la remoción de toxafeno es mayor, la acción sinérgica de los hongos pueden acelerar el proceso de biodegradación con mayor producción de las enzimas (lacasas y peroxidases) que participan en

el proceso de biotransformación (Gramos et al. 1999; Okeke et al. 1994). Los sustratos pudieron estimular la síntesis de estas enzimas (Quintero et al. 2006). Siendo la LiP (Lignina peroxidasa) la enzima que probablemente participa en la degradación de toxafeno (Lacayo et al. 2006).

Aunque en esta investigación no se evaluó la actividad enzimática, los hongos de la pudrición blanca cumplen un papel eficaz en los procesos de degradación de plaguicidas organoclorados por medio de su sistema enzimático (Mendoza, 2006). La (Lignina peroxidasa) y MnP (Manganeso peroxidasa) de *Pleurotus ostreatus* (Chung et al. 2009) y la lacasa y MnP (Manganeso peroxidasa) de *Ganoderma zonatum* (Domínguez et al. 2010) participan en la degradación del DDT. Y en la degradación de lindano están involucradas la lacasa y MnP (Manganeso peroxidasa) de *Ganoderma australe* (Dritsa et al. 2005). Por lo tanto, se sugiere que los procesos enzimáticos están involucrados en la biodegradación de toxafeno presente en el suelo contaminado del Copey.

REFERENCIAS

- ALEXANDER M, (1999) Biodegradation and bioremediation, Academic Press. London
- ARBELI Z, (2009) Biodegradation of persistent organic pollutants (POPs): I. The case of polychlorinated biphenyls (PCB). *Acta Biol Col* 14(1), 55-86.
- AUST D, BENSON J (1993). The fungus among us: Use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. *Environ Health Persp* 101(3): 232-233.
- BOVET P, (2008). Atlas medioambiental de Le Monde Diplomatique. Paris, Cybermonde
- CHUNG T, KHUE D, MINH D, CHENG F, (2009) Use of fungal humus for 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) polluted soil treatment. *Asian Journal of chemistry* 21, 5967-5972.
- DOMÍNGUEZ O, RAMOS M, MANZANO A, SÁNCHEZ M, SÁNCHEZ A, ARGÜELLES J, GUERRA G (2010) Biodegradación de DDT por dos cepas nativas de hongos de la podredumbre blanca. *Revista de Centro Nacional de Investigaciones Científicas CENIC. Ciencias Biológicas.* 41: 1 – 12
- DRITSA V, RIGAS F, AVRAMIDES E, HATZIANISTIS I (2005) Biodegradation of lindene in liquid cultures by the polypore fungus *Ganoderma australe*, in 3rd European Biorremediation Conference, Crania, Greece.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, (2010). Reference Guide to Non-combustion Technologies for Remediation of Persistent Organic Pollutants in Soil, Second Edition. Disponible en: www.clu-in.org/POPs
- FACULTAD DE AGRONOMÍA – Universidad Nacional de Colombia (2010) Análisis de riesgo del sitio contaminado antiguas bodegas de la central aldonera en liquidación (Cenalgodón) en el corregimiento de Caracolicito, municipio del Copey (Cesar). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 117 p
- GRAMOS G, KIRSCH B, VOIGT K.D, GUNTHER T, FRITSCH W (1999). Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycol Res* 103, 1009–1018
- KUCKLICK J, HELM P, (2006). Advances in the environmental analysis of polychlorinated naphthalenes and toxaphene. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 386, 819–836
- LACAYO-ROMERO M, TERRAZAS V, MATTIASSON B, (2006). Degradation of toxaphene by *Bjerkandera* sp. strain BOL13 using waste biomass as a cosubstrate. *Applied Microbiol Biotechnol* 71: 549 – 554
- LUO J, HU J, WEI FU, LI L (2015) Dehalogenation of persistent halogenated organic compounds: A review of computational studies and quantitative structure–property relationships. *Chemosphere*, 131, 17-33
- MENDOZA GM (2006) Degradación de endosulfán por *Pleurotus* spp. Universidad Autónoma de Chiapas. Tesis de Maestría, 70p.
- MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL (1997) Expediente N°1786. Folder 1-5. Almacenamiento de sustancias tóxicas en El copey. Bogotá
- OETJEN K, HORST K (1998) Levels of toxaphene indicator compounds in fish meal, fish oil and fish feed. *Chemosphere*; 37 (1),1-11
- OKEKE B.C, PATERSON A, SMITH J.E, WATSON-CRAIK I.A, (1994). Relationships between ligninolytic activities of *Lentinula* spp and

- biotransformation of pentachlorophenol in sterile soil. *Letters in Applied Microbiology* 19, 284–287.
- PURNOMO AS, KAMEI I AND KONDO R, (2008). Degradation of 1,1,1-Tricloro-2,2-bis (4-Chlorophenyl) Ethane (DDT) by Brown-Rot Fungi. *J Biosci Bioeng* 105 (6):614-621
- VALLACK H, BAKKER D, BRANDT I, BROSTRÖM-LUNDÉN E, BROUWER A, BULL K, GOUGH C, GUARDANS R, HOLOUBEK I, JANSSON B, KOCH R, KUYLENSTIERNA J, LECLoux A, MACKAY D, MCCUTCHEON P, MOCARELLI P, TAALMAN R (1998) Controlling persistent organic pollutants—what next? *Environ Toxicol Phar* 6,143-175.
- VOLDNER EC, LI YF (1993) Global usage of toxaphene. *Chemosphere* 27(10):2073–2078