



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

CAPACIDAD DE LOS BASIDIOMICETES PARA DEGRADAR ENDOSULFÁN Y CLORPIRIFÓS EN UNA MATRIZ COMPLEJA

**Basidiomycetes capability to degrade endosulfan and chlorpyrifos in a complex
matrix**

Anisleidy Rivero^{a,c}, Silvina Niell^{a,d}, Lucía Pareja^{a,d}, M. Pía Cerdeiras^b, Horacio
Heinzen^a, Verónica Cesio^{a*}.

^a Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica,
Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay.

^b Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de
la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay.

^c Laboratorio de Microbiología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Parque
Industrial Municipal Barrio Anglo, Fray Bentos, Uruguay.

^d Departamento de Química del Litoral, Polo Agroalimentario y Agroindustrial, Centro
Universitario de Paysandú, Universidad de la República, Ruta 3 km 363, Paysandú, Uruguay.

*Autor para correspondencia: +59829244068. cs@fq.edu.uy

Palabras clave: biodegradación pesticida, hongo de la podredumbre blanca.

Keywords: Biodegradation, White rot fungi, organochloride.

Título Abreviado: Degradación de endosulfán y clorpirifós por basidiomicetes

ABSTRACT

The white and brown wood rotting fungi have shown a great ability to degrade xenobiotic compounds. These properties are determined by their battery of extracellular enzymes that can convert these compounds to CO₂ and H₂O. Compounds such as endosulfan and chlorpyrifos are important in Uruguay as they are extensively used in crops such as soybean and cereals, fruits, among others. These compounds are considered recalcitrant, and in Uruguay there is not still any environmentally friendly elimination procedure in use. Therefore, bioremediation of these compounds by Basidiomycetes arises as an adequate alternative. Two strains of basidiomycetes were selected after a screening study where the bioconversion ability of 11 strains from the Department of Microbiology was assessed. From the fungi studied, three showed a promising degradation capacity, and *Abortiporus biennis* and *Bjerkandera adusta* were chosen to continue the degradation study. We evaluated the ability of these Basidiomycetes to grow in plates containing 50 and 60 mg / kg of endosulfan and chlorpyrifos individually and as a mixture, in YNB medium with and without glucose, alternating the carbon source and the compound(s) of interest. Once it was demonstrated the ability to grow in the presence of high concentrations of such pesticides, we tested the biodegradation ability of these fungi in a matrix containing rice straw immersed in semisolid agar. This parameter was evaluated after 21 and 60 days of incubation. The percentage of degradation at 60 days was 39 and 33% for α and β endosulfan and 24% for chlorpyrifos. Acetonitrile was used as the extraction solvent and the clean-up procedure was a d-SPE (dispersive Solid Phase Extraction). Detection was performed by gas chromatography with electron capture detector.

RESUMEN

Los hongos de la podredumbre blanca y marrón de la madera han demostrado presentar una alta capacidad para degradar compuestos xenobióticos. Estas propiedades están determinadas por la batería de enzimas extracelulares que pueden transformar los compuestos a CO₂ y H₂O. Compuestos como el endosulfán y el clorpirifós han sido considerados en Uruguay de importancia dado su uso indiscriminado en los cultivos

agrícolas como la soja, cereales, frutas, entre otros. Estos compuestos son considerados recalcitrantes, no existiendo en Uruguay una vía de eliminación amigable con el medio ambiente, planteándose la biorremediación como una alternativa para el estudio de la degradación de los compuestos por Basidiomicetes. En este trabajo se seleccionaron basidiomicetes a partir de un screening realizado sobre la capacidad bioconversora en 11 hongos pertenecientes a la colección de la Cátedra de Microbiología. De los hongos evaluados 3 presentaron una buena capacidad y dentro de éstos se escogieron *Bjerkandera adusta* y *Abortiporus bienis* para continuar el estudio. Se evaluó la capacidad de crecimiento de estos Basidiomicetes en placas a 50 y 60 mg/kg de endosulfán y clorpirifós individualmente y en su mezcla; en medio YNB con y sin glucosa, alternando como variables la fuente de carbono y el compuesto de interés. Una vez que se demostró la capacidad que presentaban de crecer a altas concentraciones de dichos pesticidas, se probó la capacidad de biodegradación de éstos hongos en una matriz que contenía paja de arroz inmersa en agar semisólido y el hongo en estudio. Se evaluó este parámetro a los 21 y 60 días de incubación. Los porcentajes de degradación a los 60 días fueron 39 y 33% para α y β endosulfán y 24% para el clorpirifós. Para la extracción se utilizó acetonitrilo como solvente y un-clean-up dispersivo. La detección se realizó mediante cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica.

INTRODUCCIÓN

La atenuación natural se puede describir como el conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos, que espontáneamente ocurren en un espacio determinado, con posterioridad a la aparición de la contaminación en el mismo (Moreno, 2004). Sin embargo, en muchos casos, la atenuación natural no se produce con la celeridad y eficacia suficientes para evitar los riesgos inherentes que poseen estos contaminantes para la salud humana o el medio ambiente, derivados de la existencia de un espacio

contaminado y es por lo tanto necesario realizar acciones de saneamiento o recuperación (Tabak, 1997). Existen algunos contaminantes más nocivos que otros, en particular, aquellos que no se degradan fácilmente por poseer estructuras químicas muy estables, permanecen en el ambiente por años y son incorporados a las cadenas alimenticias en un proceso llamado bioacumulación, en el cual, concentraciones del orden de los ng.kg^{-1} de contaminantes no degradables en el ambiente, se acumulan en tejidos adiposos de los distintos integrantes de la cadena hasta alcanzar concentraciones del orden de los mg.kg^{-1} en aquellos animales que están en la cima de la cadena alimenticia (Pointing, 2001).

Estos compuestos llamados “recalcitrantes” representan un riesgo muy alto para la salud y su empleo, se regula controla y prohíbe cada vez más. El ejemplo típico de compuestos recalcitrantes son los compuestos organoclorados (PCBs, dioxinas cloradas) y en particular los insecticidas organoclorados (Keum, 2004). La utilización de estos compuestos está cada vez más restringida pero existen algunos aún en uso. Tal es el caso del endosulfán, el cual fue empleado en la agricultura a nivel mundial, pero desde el año 2007 se encuentra prohibido por la Unión Europea (Kumar & Philip, 2006). Un inconveniente grande con el endosulfán es que el producto de descomposición más frecuente, sulfato de endosulfán, es más persistente que el propio endosulfán (Weir, 2006). El status regulatorio de dicho pesticida difiere de un país a otro, pero muchos países han considerado pertinente regular específicamente su uso, ya sea prohibiendo, o restringiéndolo. En Uruguay, el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca prohibió su importación a partir de enero de 2011 y su uso desde diciembre de 2011. En nuestro país, el endosulfán se ha usado intensivamente (aproximadamente 200 ton/año) y a

pesar de las prohibiciones actuales, por su característica de sufrir bioacumulación es necesario contar con una herramienta que permita remediarlo.

El clorpirifós es un insecticida organofosforado muy empleado también en la agricultura de Uruguay para el control de plagas en diferentes cultivos como la soja, el girasol, el trigo, la cebada, la avena, y muchas frutas y hortalizas, que pueden ocasionar grandes pérdidas tanto (-) en la economía agrícola como ganadera según se reporta en la guía para el agricultor (SATA Guía). Para la soja, dependiendo de la plaga contra la cual se protege, se emplean la cantidad necesaria de los concentrados comerciales a base de clorpirifós de 480 g.L⁻¹, por ejemplo para *Epinotía* se emplean de 800-1300 cc.ha⁻¹ sin embargo para *Plusias* se emplean entre 750-1200 cc.ha⁻¹. El organofosforado en cuestión presenta un valor de solubilidad en agua de 1.4 mg/L, K_{oc} de 6000, vida media de 7-15 días, y un potencial de escurrimiento bajo (0.15), pero los parámetros fisicoquímicos de su metabolito, el 3,5,6-tricloro-2-piridinol, presentan valores que lo hacen permanecer por más tiempo tanto en el ambiente como en el agua, por su alto valor de solubilidad 80.9 mg/L, o en el suelo por su valor de K_{oc} de 149. Por esta razón es de suma importancia la búsqueda de una herramienta de bioconversión del mismo.

Estudios de descontaminación biológica se han centrado en el uso de bacterias por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados contaminantes. Así mismo la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos en CO₂ y H₂O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos

de tratamiento de contaminaciones (Moreno, 2004). Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes de los suelos. El elevado valor de la relación superficie/volumen celular de los hongos filamentosos les convierte en eficaces degradadores en determinados nichos como los suelos contaminados. Particularmente, los hongos de la podredumbre blanca (PB) han demostrado una gran versatilidad en este tipo de aplicaciones. Dichos hongos son basidiomicetes, comunes en bosques de pino, encino y eucaliptos (Christian, 2005), y su denominación como hongos de la PB, deriva de su capacidad de mineralización de la lignina y sus derivados que le da a la madera un aspecto blanquecino (Pointing, 2001). Estos hongos realizan una función natural esencial en la conversión de lignina cuya producción es de 20.3×10^{12} kg/año, este es un polímero polifenólico heterogéneo que se degrada por oxidación. El reciclaje de lignina por hongos de la PB, es un factor fundamental del ciclo del carbono en los bosques, una de las mayores reservas de carbono orgánico del suelo (Christian, 2005). Los hongos de la PB se han aplicado con éxito a la degradación de contaminantes recalcitrantes, particularmente compuestos aromáticos clorados.

Este trabajo propone una primera aproximación para la construcción de un modelo de eliminación en condiciones no contaminantes de pesticidas organoclorados y organofosforados, tomando como modelo el endosulfán y el clorpirifós. Estas condiciones no contaminantes se tratan de conseguir a través del proceso biotecnológico

conocido como biorremediación o descontaminación biológica (Weir, 2006; Mukherjee & Mittal, 2005; Kwon, 2005).

METODOLOGÍA

Selección de microorganismos

Se evaluaron 11 basidiomicetes de la colección de la Cátedra de Microbiología crecidos en el medio sólido conteniendo YNB con glucosa al 1% y 50 mg/kg de endosulfán.

La capacidad biotransformadora se evaluó con los basidiomicetes en medio YNB con y sin 1% de glucosa por 12 días a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se evaluó el endosulfán y el clorpirifós individualmente y la mezcla de ambos, a 50 mg/kg de endosulfán y 60 mg/kg de clorpirifós.

La matriz usada para la evaluación del porcentaje de bioconversión fue preparada a escala de laboratorio con afrechillo de arroz, agar semisólido e inóculo microbiano. A dicha matriz se le adicionó endosulfán y clorpirifós en concentraciones de 50 mg/kg y 60 mg/kg respectivamente.

Para el ensayo se prepararon 5 réplicas de la matriz y se adicionaron 50 mg/kg para endosulfán y 60 mg/kg para clorpirifós. Se realizaron los blancos constituidos por matriz sin hongo con los agroquímicos, matriz con micelio muerto y los agroquímicos y

matriz con el basidiomicete. Se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se realizaron tomas de muestras a los 21 y 60 días. Las muestras fueron extraídas utilizando un método validado en el laboratorio que emplea acetonitrilo como solvente y un clean-up dispersivo con las sales MgSO_4 y NaCl .

La determinación analítica se realizó en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 17A con detector de captura electrónica (ECD) y un inyector PTV. Resuelto con una Mega Columna capilar 60 (30m, 0.32mm de diámetro interno y $0.25\mu\text{m}$ de grosor). La temperatura del detector fue de 280°C .

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Del screening realizado sobre los 11 hongos, se seleccionaron los basidiomicetes *Bjerkandera adusta* y *Abortiporus biennis* para continuar el estudio. Los microorganismos fueron capaces de crecer en el medio YNB con y sin glucosa en presencia de los agroquímicos individualmente así como en la mezcla según se muestra en la Figura 1. Este ensayo permitió determinar cualitativamente que el basidiomicete fue capaz de crecer en el medio con 1% de glucosa en presencia de los agroquímicos en estudio. La cantidad de biomasa generada en este caso fue mayor en comparación con la biomasa obtenida al crecer el microorganismo en el medio sin la adición de glucosa. Se demostró que los hongos del estudio son capaces de crecer en endosulfán y clorpirifós como única fuente de carbono, así como en presencia de cada uno de ellos independientemente.

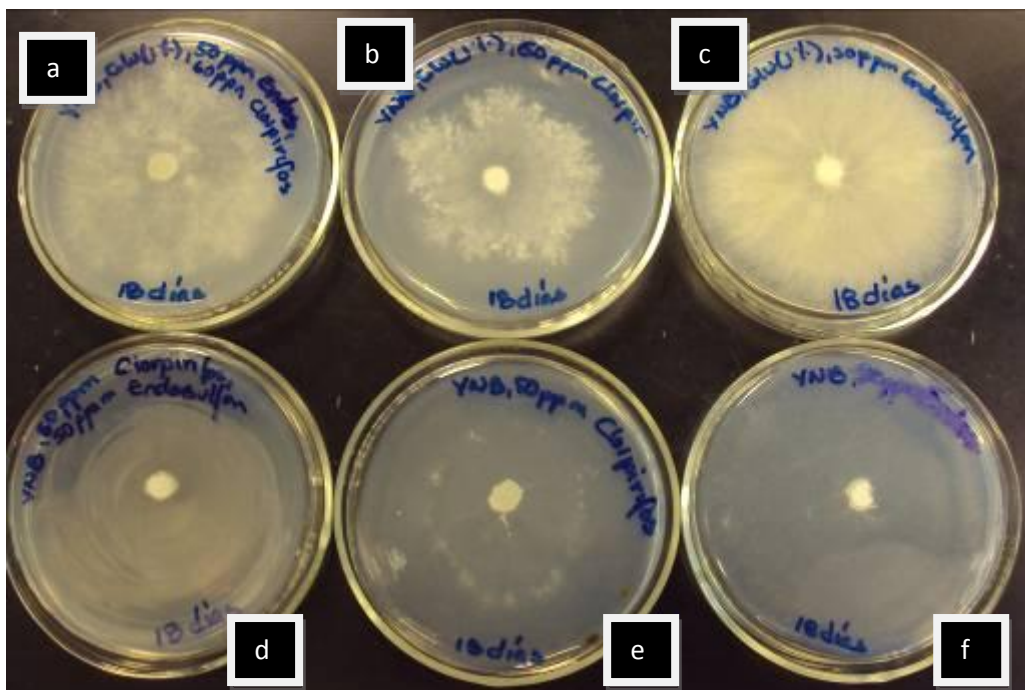


Figura 1. Crecimiento de la cepa de *Abortiporus* en el medio YNB con glucosa(a,b,c) y sin glucosa(d,e,f) con 60 mgkg^{-1} clorpirifós(b,e) y 50 mgkg^{-1} de endosulfán(c,f) y en la mezcla de 60 mgkg^{-1} de clorpirifós y 50 mgkg^{-1} de endosulfán (a,d) incubados 18 días a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Figure 1. *Abortiporus* strain growing in YNB medium with glucose (a, b, c) and without glucose (d, e, f) with 60 mgkg^{-1} clorpirifós (b, e) and 50 mgkg^{-1} of endosulfan (c, f) and the mixture of 60 mgkg^{-1} of chlorpyrifos and 50 mgkg^{-1} of endosulfan (a, d) incubated 18 days at $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

La capacidad de transformación de endosulfán y clorpirifós por los basidiomicetes seleccionados fue evaluada. Los cálculos se realizaron tomando como el 100% la cantidad de compuesto obtenida en los blancos que contenían los compuestos de interés y el afrechillo de arroz. El porcentaje de degradación a los 60 días fue 39% y 33 % para α y β endosulfán respectivamente y 24% para el clorpirifós según se muestra en la

Figura 2. Como se puede observar en la Figura 2, a los 21 días el hongo solo transforma el isómero α del endosulfán y el clorpirifós; sin embargo a los 60 días es capaz de transformar todos los compuestos evaluados.

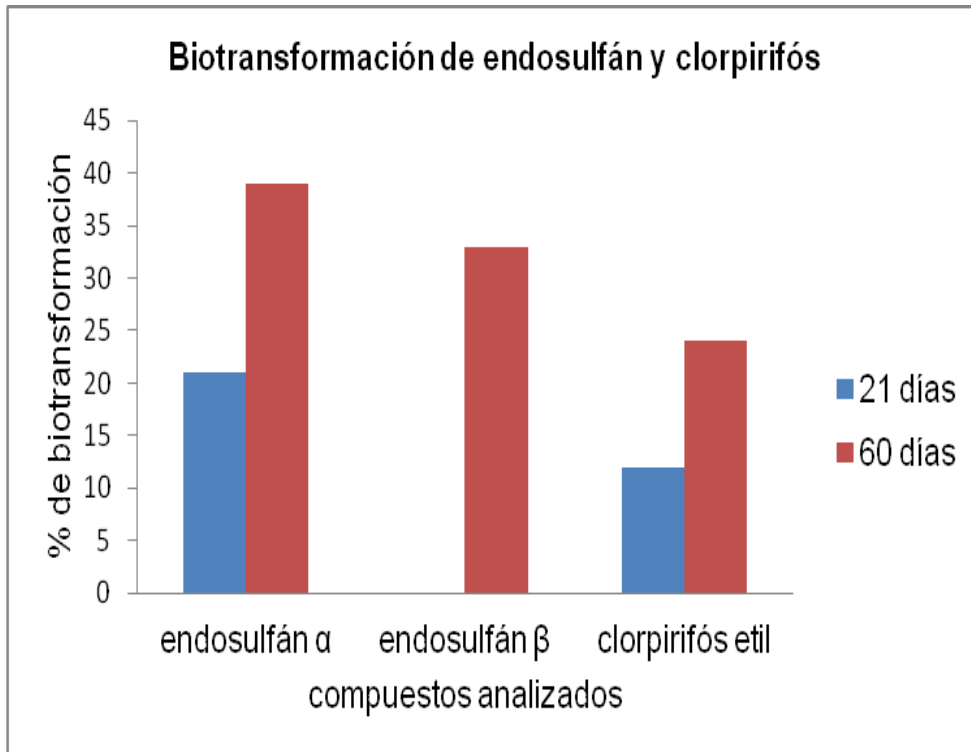


Figura 2. Degradación de endosulfán y clorpirifós por cepa de *Abortiporus* durante 60 días de incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$.

Figure 2. Endosulfan and chlorpyrifos degradation by *Abortiporus* strain during 60 days of incubation at $28\pm 2^\circ\text{C}$.

CONCLUSIONES

Los basidiomicetes *Bjerkandera adusta* y *Abortiporus biennis* son capaces de crecer en endosulfán a 50 mg/kg y de utilizar el endosulfán y el clorpirifós como única fuente de carbono y energía.

Estos resultados permiten utilizar la capacidad biotransformadora de dichos hongos para futuras aplicaciones en la remediación de compuestos recalcitrantes bajo condiciones amigables con el medio ambiente tanto en la agricultura como la ganadería.

AGRADECIMIENTOS

ANII. Fondo María Viñas. PEDECIBA QUÍMICA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Christian,V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H. A., & Vyas, B. R 2005. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *Indian J Exp Biol*, 43: 301-303
- Keum YS & Li Q X. 2004. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, 56: 23-30
- Kumar M & Philip L. 2006 Enrichment and Isolation of a Mixed Bacterial Culture for Complete Mineralization of Endosulfan. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 41: 81-96
- Kwon, Gi-Seok, Sohn, Ho-Yong, Shin, Kee-Sun, Kim, Eungbin, & Seo, Bu-II. 2005. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the

- toxic metabolite, endosulfan sulfate by *Klebsiella*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 845-850
- Martín Moreno CM, González Becerra,A.& Blanco Santos MJ .2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación *Revista Iberoamericana de Micología*, 21: 103-120
 - Mukherjee I & Mittal A. 2005. Bioremediation of Endosulfan Using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75: 1034-1040
 - Pointing SP. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 20-33
 - Tabak HH, Govind R, Fu C, & Gao C . 1997. Protocol for determining bioavailability and biodegradation kinetics of organic soil pollutants in soil systems to enhance bioremediation of polluted soil sites. *Meth in Biotechnol*, 2: 223-240.
 - Weir K. M. Sutherland, T. D. Horne, I.Russell, R. J.& Oakeshott, J. G. .2006. A Single Monooxygenase, Ese, Is Involved in the Metabolism of the Organochlorides Endosulfan and Endosulfate. *Appl Environ Microbiol*, 72: 3524-30.
 - Guía para la protección y nutrición vegetal. SATA 2012 Disponible en:<http://laguiasata.com/joomla/>

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- **Figura 1.** Crecimiento de la cepa de *Abortiporus* en el medio YNB con glucosa(a,b,c) y sin glucosa(d,e,f) con 60 mgkg⁻¹clorpirifós(b,e) y 50 mgkg⁻¹ de endosulfán(c,f) y en la mezcla de 60 mgkg⁻¹ de clorpirifós y 50 mgkg⁻¹ de endosulfán (a,d) incubados 18 días a 28±2°C.
- **Figura 2.** Degradación de endosulfán y clorpirifós por cepa de *Abortiporus* durante 60 días de incubación a 28±2°C.