

DEGRADACION DE CLOROFENOLES EN SOLUCIONES SINTETICAS UTILIZANDO HONGOS H3

Bellot Ilicia¹, Mollinedo Patricia¹, Gemio Rómulo¹, Morales Isabel², Moraes Mónica³

¹Instituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN), Carrera de Ciencias Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, Calle Andrés Bello y Calle 27 Cota Cota, Edificio FCPN, 2º piso, La Paz- Bolivia. ²Instituto de Biología Molecular, Carrera de Biología, Universidad Mayor de San Andrés, Calle Andrés Bello y Calle 27 Cota Cota, La Paz Bolivia, ³Instituto de Ecología, Carrera de Biología, Universidad Mayor de San Andrés, Calle Andrés Bello y Calle 27 Cota Cota, La Paz Bolivia

Keywords: Fungi, chlorophenol degradation

ABSTRACT

The National Herbarium of Bolivia collected wood-degrading fungi in La Asunta region. The objective was fungi used as a chlorophenol-degrading agent. The fungus H3.ssp (without speciation) was selected in an *in vitro* culture due to its degrading capacity, quantifying three organochlorine compounds: 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol or Triclosan. Samples were taken from the culture broth extract. The parameters evaluated were the kinetics of absorption and desorption of chlorophenolic compounds made by fungi (absorbate), using the technique of quantifying the initial and final concentrations by gas chromatography. The maximal adsorption of chlorophenols by fungi was obtained for Triclosan H3 followed by the 2,4-dichlorophenol and finally the 4-chlorophenol. The adsorption affinity towards more substituted chlorophenols is due to the low polarity that is according to: the more substitutions has the phenol the less soluble is in polar solvents (water). Chlorophenols trapped by H3 fungi were clearly pH dependent, therefore, the adsorption of chlorophenols increases as a function of pH. Desorption of chlorophenols was achieved using methanol 30% v / v. And finally it has been reported that H3 fungi are suitable for its use for more than 5 cycles without noticeable loss of adsorption capacity.

Corresponding author: pattymollinedo@gmail.com

RESUMEN

El Herbario Nacional de Bolivia ha colectado hongos degradadores de madera en la región de La Asunta, con el objetivo de utilizar su potencial degradador de clorofenoles, los mismos que han sido evaluados. El hongo H3.ssp (sin especiación) fue seleccionado en cultivos *in vitro* y se cuantificó su capacidad degradadora para tres compuestos organoclorados: 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol ó Triclosan; muestras que fueron tomadas del extracto del caldo de cultivo. Los parámetros evaluados fueron la cinética de absorción y desorción de los compuestos clorofenolicos efectuado por los hongos (absorbatos), mediante la técnica de cuantificación de las concentraciones iniciales y finales por cromatografía de gases. La máxima adsorción de clorofenoles conseguida por los hongos H3 fue para Triclosan seguida del 2,4-diclorofenol y finalmente el 4-clorofenol. La afinidad de la adsorción hacia clorofenoles mas sustituidos, se debe a la baja polaridad, es decir cuantas más sustituciones tenga el fenol en la molécula será menos soluble en solventes polares (agua). Los clorofenoles atrapados por los hongos H3 fueron claramente dependientes del pH, por lo tanto, la adsorción de los clorofenoles se incrementa en función del pH. La desorción de los clorofenoles se ha conseguido utilizando metanol al 30% v/v. Y finalmente se ha logrado reportar que los hongos H3 son adecuados para ser utilizados por más de 5 ciclos sin notable pérdida de la capacidad de adsorción.

INTRODUCCION

Los resultados presentados en distintos trabajos (Rodriguez, S. E. 2006) muestran que los hongos del género Basidiomicetos son capaces de transformar y mineralizar compuestos clorofenólicos, lo que confirma su potencial aplicación en estrategias de biorremediación. Estudios anteriores mostraban ciertas dudas sobre la implicación de enzimas ligninolíticas en la degradación de este tipo de contaminantes medioambientales por hongos del género Basidiomicetos. Sin embargo, los estudios (Rodriguez, S. E. 2006) *in vitro* realizados demostraron que con las enzimas ligninolíticas lacasa y peroxidasa versátil purificadas del hongo del genero Basidiomicetos (*Pleurotus*), así

como la detección de sus actividades durante los procesos de transformación en cultivo, sugieren su implicación en la degradación de 2,4- diclorofenol y benzo(a)pireno confirmando los resultados obtenidos con otros basidiomicetos de podredumbre blanca. Los clorofenoles son utilizados como biocidas (Field y Sierra-Alvarez, 2008). Se han elegido tres tipos de compuestos clorofenolicos: 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y triclosan, por ser los de menor acción toxica, para prevenir cualquier acción toxica en la salud de los implicados. Los clorofenoles son un grupo de compuestos químicos en los que se han adicionado uno o varios átomos de cloro a la molécula del fenol. La toxicidad de los clorofenoles depende del grado de sustitución y de la ubicación de los átomos de cloro y en general estos compuestos son considerados como uno de los contaminantes más peligrosos a nivel mundial (Steirt y Crawford, 1985). La alta riqueza biológica de los Yungas de Bolivia hace de ella una zona promisoría para la búsqueda de especies de hongos con alto potencial degradador. Según Boekhout (1983), los bosques son ricos en hongos por tres factores principales: las condiciones climáticas favorables, la existencia de mayor variedad de sustrato y mayor estabilidad en la humedad del aire. En el municipio de La Asunta (Yungas del departamento de La Paz) se han realizado relevamientos preliminares sobre diferentes tipos de macrohongos. El presente estudio ha tomado en cuenta estos antecedentes y aunque no se dispone de mucha información sobre este grupo de organismos, se han hecho los esfuerzos para su recolección y tratamiento, en la premisa de que un buen relevamiento de la riqueza y dónde encontrarlos, así como los estudios sobre su potencial degradador de xenobióticos sería de mucha importancia para su protección y para la formulación de estrategias de biorremediación.

SECCION EXPERIMENTAL

Método

Los pasos se han dividido de la siguiente manera: la primera etapa del trabajo se orientó a realizar las curvas de calibración con soluciones patrón preparadas en el laboratorio de productos Naturales de la carrera de Ciencias Químicas, mismos que fueron medidos en un equipo de última tecnología en cromatografía de gases (Agilent Technology 7890 A System) la segunda etapa estuvo centrada en el tratamiento de las muestras realizando extracciones de clorofenol del caldo residual del cultivo de los hongos con la adición de clorofenoles, para concluir con la tercera etapa dedicada a la medición de las cantidades de clorofenol extraído del caldo residual del cultivo de los hongos en el cromatografo de gases. La lectura de los cromatogramas y la comparación con las curvas de calibración han determinado la concentración del clorofenol en las muestras.

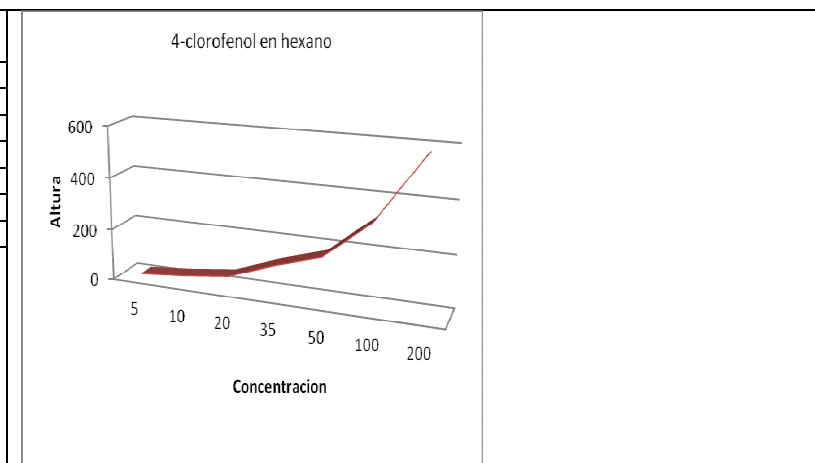
Datos

Las curvas de calibración se realizaron con el promedio de los datos obtenidos de los cromatogramas, leídos en el cromatografo de gases, para los patrones; el 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y Triclosan. Se graficó las Alturas vs. Concentraciones, porque fueron los datos las más coherentes en los cromatogramas, no siendo así los datos de las áreas, por que los anchos de banda variaban notablemente, debido a la cantidad de compuesto que pasaba aleatoriamente, del inyector a la columna del cromatógrafo.

Curvas de calibración

Conc. ppm	Altura pA
5	14,6
10	30,9
20	53,4
35	121,3
50	177,9
100	326,2
200	577

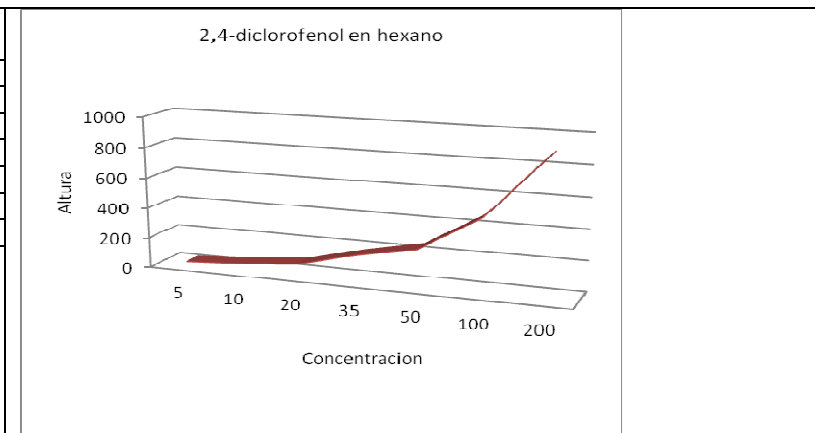
Tabla 1



Gráfica 1 Curva de calibración para el 4-clorofenol disuelto en hexano.

Conc. ppm	Altura pA
5	23,8
10	46,9
20	80,9
35	176,6
50	251,3
100	480,1
200	892,7

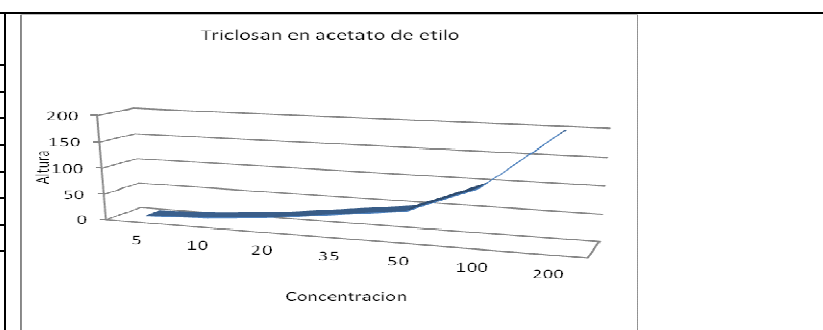
Tabla 2



Gráfica 2 Curva de calibración 2,4-diclorofenol disuelto en hexano.

Conc. ppm	Altura pA
5	3
10	7
20	13
35	20
50	27
100	90
200	150

Tabla 3



Gráfica 3 Curva de calibración de Triclosan disuelto en acetato de etilo.

Cromatogramas

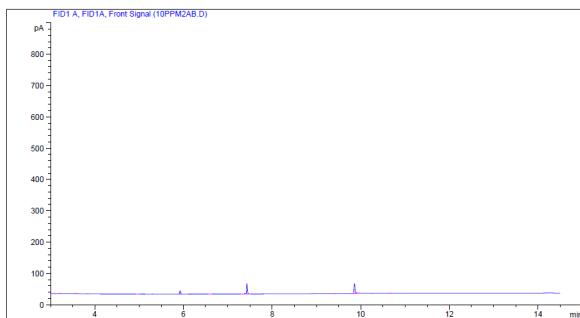


Fig 1 10 ppm de 4-clorofenol (sol. patrón)

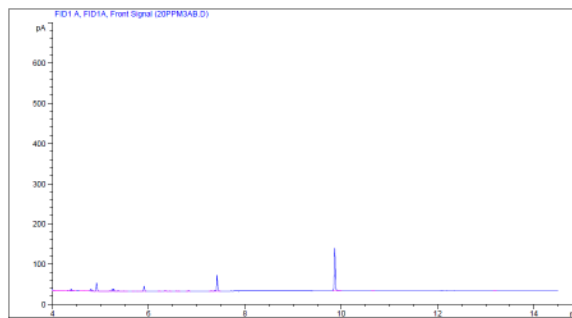


Fig 2 20 ppm de 4-clorofenol (sol. patrón)

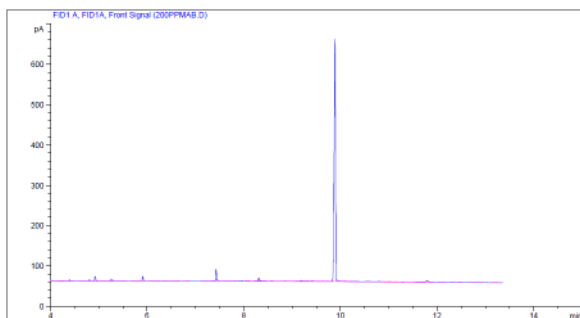


Fig 3 200 ppm de 4-clorofenol (sol. patrón)

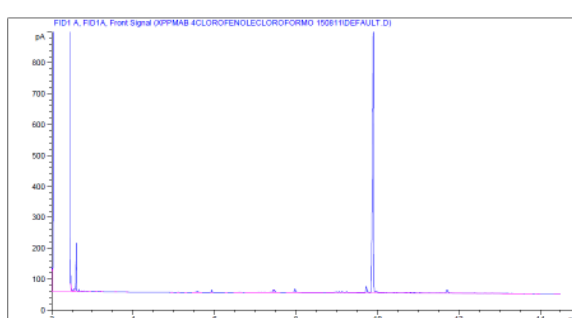


Fig 4 Muestra con 4-clorofenol

Aquí vemos un ejemplo de los cromatogramas obtenidos por las leidas de soluciones patrón en el cromatografo de gases. Los cromatogramas se obtuvieron por triplicado, es decir cada solución patrón se leyó tres veces en diferentes viales. Las concentraciones en las que se trabajo fueron: 5, 10, 20, 35, 50, 100 y 200 ppm.

RESULTADOS, DISCUSION

La primera parte del trabajo se dedico a la obtención de las curvas de calibración. Posteriormente se trato las muestras obtenidas de los extractos de los caldos de cultivo del hongo H3 para separar el clorofenol colocado en el caldo de cultivo para su degradación, tomando en cuenta, la afinidad hacia los solventes y la adsorción de los hongos por medio del pH, viéndose el incremento de adsorción de acuerdo al aumento del pH. Finalmente se leyó en el cromatografo de gases las muestras, los datos obtenidos se los comparo con las curvas de calibración para obtener las concentraciones finales de los clorofenoles. La desorción de los clorofenoles se ha conseguido utilizando metanol al 30% v/v. Y finalmente se ha logrado reportar que los hongos H3 son adecuados para ser utilizados por más de 5 ciclos sin notable pérdida de la capacidad de adsorción. Se sigue trabajando sobre este tema, porque existe una gran variedad de combinaciones en los solventes, para optimizar la separación del compuesto clorofenolico del caldo de cultivo, también controlar otros parámetros la solubilidad y como el pH, para mejorar la adsorción del hongo H3.

REFERENCIAS

1. Adil, D. Nilüfer, C. Abbas, Y. Müge T. Gülerenr A. 2004. Removal of chlorophenols from synthetic solutions using *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 39 (2004) 2025-2030
2. Boekhout, T. 1983. Distribucion y ecología de hongos macroscópicos (datos iniciales). En: Van Der Hammen T., P. Poliodoro & A. Perez (eds) *Estudios de ecosistemas tropandinos de la cordillera central colombiana, transecto Parque Los Nevados (introducción y datos iniciales)*. Volumen 1. Strauss & Cramer GmbH, Berlin.
3. Field, J & R. Sierra-Alvarez, 2008. Microbial degradation of chlorinated phenols *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 7:211-241.
4. Levin L., Viale, A., and Forchiassin, A. 2003. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodet and Biodeg.* 52:1-5
5. Rodríguez, S. E. caracterización molecular de lacasas de *pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Tesis doctoral en Biología. Universidad Complutense de Madrid
6. Scheel, T., M. Hofer, S. Ludwig & U. Holker. 2000. Differential expression of manganese peroxidase and lacassa in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 686-691.
7. Usnayo, P. 2007. Optimización de medio de cultivo, para la producción de enzimas ligninolíticas, por cepas fungicas aisladas del altiplano Boliviano. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. UMSA
8. Veldhoen, N., R. C. Skirrow, et al. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat Toxicol* 80(3)(2006): 217-27.
9. Veldhoen, N. Skirrow, R. C. et al. Corrigendum to "The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development" [*Aquat. Toxicol.* 80 (2006) 217-227] *Aquat. Toxicol.*, Volume 83, Issue 1, 5 June 2007, Page 84