



Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica.

Primera parte: Uso de hongos en biorremediación

CHÁVEZ, GEORGINA¹

ESTRADA, NELSON¹

GÓMEZ, JOSÉ¹

CHOQUE, REYNALDO¹

CRESPO, CARLA¹

ALVAREZ, MARÍA TERESA¹

CORRESPONDENCIA: GEORGINA CHÁVEZ LIZÁRRAGA.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS, FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS, UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS, AV. SAAVEDRA 2224. LA PAZ, BOLIVIA.

GEORGINACHA@GMAIL.COM

Resumen

El potencial de las cepas fúngicas en biorremediación, que han sido aisladas en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), es bastante amplio, se han encontrado cepas que han sido usadas en investigaciones a nivel internacional, tal es el caso de *Bjerkandera sp* BOL 13, un hongo aislado en un efluente contaminado con aceite en Oruro, con capacidad de degradar varios compuestos hidrocarbonados aromáticos policíclicos. En otro extremo de la nación se logró aislar *Galerina sp.*, un hongo productor de lacasas, enzima importante en los procesos de decoloración.

Abstract

The potential of fungi strains in bioremediation that have been isolated in the Institute of Research Pharmaceutical and Biochemical (IIFB) is broad, it have been found strains that have been used in research at international level, as *Bjerkandera sp* BOL 13, a fungi isolated in an oil contaminated effluent, able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. In other side of the country *Galerina sp.* was isolated, a laccase producing fungi, an enzyme important in decolorizing processes.

contaminado con aceite en Oruro, con capacidad de degradar varios compuestos hidrocarbonados aromáticos policíclicos.

¹ Área de Biotecnología Fúngica. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

PALABRAS CLAVE

Biorremediación, *Bjerkandera* sp BOL 13., compuestos hidrocarbonados aromáticos policíclicos, lacasas, decoloración.

KEY WORDS

Biorremediation, *Bjerkandera* sp BOL 13., polycyclic aromatic hydrocarbons, laccases, decolorizing.

INTRODUCCIÓN

Bolivia es un país muy rico en biodiversidad, nuestros diferentes ambientes geográficos hacen que sea posible encontrar nichos ecológicos con la presencia de microorganismos con características notables. En los diferentes viajes de recolección realizados por el Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas (IIFB) se ha logrado coleccionar una variedad de hongos que han demostrado ser importantes degradadores de compuestos tóxicos, especialmente los hongos de la podredumbre blanca que producen enzimas ligninolíticas que contribuyen a su capacidad biodegradadora. La actividad biodegradadora de los hongos puede aprovecharse usando el microorganismo o se pueden aislar sus enzimas. En este review se hace énfasis en los hongos con capacidad de degradación de compuestos recalcitrantes y en degradación de tinturas tipo azo que contaminan los efluentes de agua. El hongo *Bjerkandera* cepa BOL 13 es sin duda uno de los más mencionados a través del artículo ya que mostró una capacidad impresionante para degradar muchos compuestos orgánicos tóxicos que van desde colorantes como el Rojo Reactivo 2 y el Azul reactivo 4 hasta pesticidas como el toxafeno. En el caso de enzimas usadas para la degradación de tinturas tipo azo, la lacasa aislada de *Galerina* sp., un hongo recolectado en la amazonía boliviana mostró ser eficaz en la remoción de tintes y se logró establecer un sistema que permite el reciclaje de la enzima.

Es interesante mencionar que muchas cepas aisladas en el país han sido objeto de estudios no solo a nivel nacional sino internacional. Mucha de la información de este review ha sido coleccionada de tesis realizadas en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas y en la Universidad de Lund. Otro punto importante de las investigaciones es que muchas veces se han dado colaboraciones con otras facultades como Ingeniería y Biología, lo que permite ampliar el ámbito de estudios, así estudios de genotoxicidad y simulaciones en campo han hecho posible el extender los estudios iniciales realizados en el IIFB, dándoles mayor impacto.

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS RECALCITRANTES USANDO CEPAS FÚNGICAS

Los compuestos hidrocarbonados aromáticos policíclicos (HAPs) están en la lista de contaminantes de prioridad, por su ubicuidad en el medio ambiente, toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Terrazas et al., 2005).

Por lo tanto, se está en una búsqueda permanente para encontrar nuevas formas de eliminar estos compuestos.

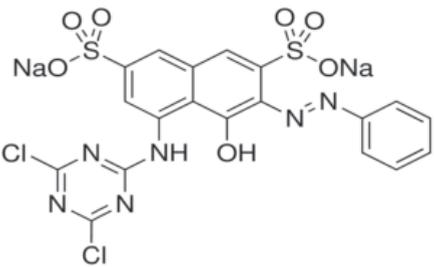
Una de los métodos alternativos para degradación de estos compuestos es la biorremediación que se basa en la utilización de microorganismos y su potencial metabólico biodegradador para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inócuos (Alexander, 1999). Los hongos fueron reconocidos como degradadores eficientes de compuestos orgánicos a mediados de los 80's (Bumpus et al., 1985). Los hongos de la podredumbre blanca, en especial, poseen enzimas oxidativas esenciales para la degradación de lignina y por lo tanto son capaces de degradar HAPs (Pointing et al., 2011).

El potencial de los microorganismos en procesos de biorremediación en Bolivia fue explorado a partir del año 2002 (Chuquimia, 2002), pero no fue hasta el 2004 que se puso más énfasis al estudio de cepas fúngicas en biorremediación, después de coleccionar muestras en un efluente contaminado con petróleo en Toma-Toma Oruro se aisló una cepa fúngica identificada en ese entonces como *Bjerkandera adusta*, la misma se caracterizaba por su alta capacidad de consumir antraceno, fenantreno y benzopireno en placas de mineral agarizado usando concentraciones de hasta 80 ppm de cada compuesto (Mendoza, 2004).

Posteriormente, se estudiaron otras 5 cepas aisladas también de Toma-Toma en Oruro entre las que se encontraban *Botrytis*, *Geotrichum*, *Pithium*, *Wardomyces*, *Verticillium* y *Bjerkandera* y luego de ser sembradas en medio Poly R-478 se determinó que *Bjerkandera sp.* fue la que presentó el halo más grande de decoloración, por lo que fue estudiada a más profundidad, tratando primero de optimizar la producción de enzimas ligninolíticas (Terrazas et al., 2005), para luego comprobar su capacidad de degradación en varios compuestos orgánicos (Tabla 1), con modificaciones en el medio de cultivo, muchas veces superando en porcentajes de degradación incluso a la bien estudiada *Trametes versicolor* (Terrazas et al., 2005 y Soares et al., 2005).

Tabla 1

Compuestos degradados por *Bjerkandera* cepa BOL13

Compuesto	Estructura	Degradación (%)	Referencia
Rojo Reactivo 2		99	Axelsson et al., 2006

Azul Reactivo 4		99	Axelsson et al., 2006
Fenantreno		99.9	Terrazas et al., 2005
Toxafeno		85	Lacayo et al, 2006, Lacayo, 2005
Nonilfenol		99	Soares et al., 2005, Soares, 2005

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos fue estudiada en cooperación con el Instituto de Investigaciones de Procesos Químicos (IIDEPROQ), en este estudio se simulaban las condiciones del suelo del Altiplano en laboratorio y se evidenció que la cepa fúngica LQG9B demostró degradar el benzopireno y fenantreno en un 79 y 73% respectivamente (Oñiveros, 2011).

TRATAMIENTO FÚNGICO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL

La aplicación de colorantes en la industria, (papel, textiles, y otras) constituye un problema creciente tanto para el entorno ambiental como en los procesos de teñido. Los efluentes de la industria textil generalmente terminan contaminando los diferentes cuerpos de agua principalmente con tinturas azo debido a que este tipo de colorantes son lo más usados por su bajo precio (Chung y Stevens, 1993). Esta clase de colorantes son xenobióticos y su degradación en la naturaleza es bastante difícil ya que son estables a la luz, calor y agentes oxidantes (Leena, R. y Selva, R., 2008). La mayoría de los tratamientos físicos y químicos no logran una decoloración total de los efluentes o tienen dificultades operacionales o son demasiado caros (Robinson et al., 2001).

Una opción que presenta innumerables ventajas, es el desarrollo de técnicas para el uso de agentes biológicos capaces de obtener mejores o similares resultados en las industrias, sin tener que influir de manera negativa en el

medio ambiente. La decontaminación de agentes cancerígenos de las aguas residuales derivadas de las industrias, así como la mejora de los procesos de decoloración y teñido, implementado microorganismos o derivados de los mismos, son estrategias que proporcionan mayor rendimiento y fácil aplicabilidad. En un principio los tratamientos biológicos involucraban solamente bacterias, sin embargo con el pasar de los años llegó a ser aparente la importancia de los hongos en los procesos de degradación de xenobióticos.

El primer hongo que se usó en la decoloración de colorantes tipo azo fue *P. chrysosporium* (Cripps et al., 1990) y desde entonces otros hongos como *Bjerkandera adusta* (Eichlerova et al., 2007) y *Trametes versicolor* (Borchert, M. y Libra, J., 2001; Axelson et al., 2006) mostraron ser eficientes como decolorantes de tintas.

En Bolivia uno de los primeros estudios usando cepas fúngicas para decoloración en tintes demostró que *Bjerkandera* sp. cepa BOL13 (Terrazas, et al., 2005), una cepa almacenada en el cepario del IIFB mostró capacidad de decoloración sobre los tintes de textiles Red 2 y Blue 4, logrando decolorar estos tintes tanto en medio líquido como en placas lográndose un 99% de decoloración para ambos tintes (Tabla 1) (Axelsson et al., 2006; Terrazas, et al., 2005). Otra cepa con potencial en el tratamiento de efluentes contaminados con tinturas azo es la cepa IB105, la misma evaluada en la acción enzimática celulolítica sobre telas de algodón. Para tal fin, se elaboró un fermento que permitió la liberación de glucosa después del tratamiento enzimático en la tela. Luego de la biocatálisis se evidenció la pérdida de peso en los textiles, con la una pequeña pérdida de coloración (Terrazas et al., 2010 y Torrez et al., 2010). Otros hongos con capacidad de decoloración de tintes estudiados en Bolivia incluyen las cepas fúngicas *Corioloopsis polizona* MUCL33483, *Penicillium* sp. MUBA001 y *Pycnoporus* sp. MUBA002 que mostraron capacidad de decoloración en el tinte Reactive Black 5 alcando hasta un 90% de decoloración en medio líquido a una temperatura de 25 oC (Salas et al., 2013,2012).

ENZIMAS FÚNGICAS DE IMPORTANCIA EN PROCESOS DE DECOLORACIÓN

Enzimas fúngicas extracelulares han demostrado tener ventajas sobre el uso del hongo como tal, ya que existen menos limitaciones de transferencia de masa, además el uso de enzimas puede sustituir reacciones que conllevan la emisión de agentes tóxicos para el ser humano y el entorno ambiental, más aún el uso de enzimas ofrece la posibilidad de degradar colorantes en la ausencia o presencia de mediadores (Ibrahim et al., 2011; Mendoza et al., 2011). La oxidación catalizada por enzimas, (lacasas) es categorizada como "reacción verde", debido a la gran capacidad de remover los contaminantes de las aguas residuales y no ser agentes tóxicos para el entorno ambiental.

Procesos de decoloración se llevaron a cabo en colaboración con la Universidad de Lund (Suecia) usando lacasas aisladas de *Galerina* sp un hongo de la amazonia boliviana y de *Trametes versicolor*, obteniéndose los mejores resultados con la lacasa de este último, lográndose decoloraciones del 98, 88, 80 y 78% para Red FN-2BL, Red BWS, Remazol Blue RR y Blue 4BL, respectivamente, algo remarcable de este estudio es que en un reactor de membrana

se logró el repetido uso de la lacasa hasta 9 veces, más aún el reuso de la enzima puede incrementarse con la adición de EDTA disminuyendo de esta manera los costos del proceso (Mendoza 2011).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las cepas fúngicas aisladas en el país han demostrado ser altamente eficientes en procesos de biorremediación. Si bien se ha logrado identificar molecularmente a *Bjerkandera* sp. BOL 13, queda pendiente un estudio más a profundidad de sus enzimas ligniolíticas, más aún estudios en una escala mayor se hacen necesarios. Enzimas como las lacasas pueden ser encontradas en otros hongos del cepario del IIFB. El estudio de métodos de tamizaje rápido podrá hacer que se acelere el descubrimiento de estas enzimas. Aún existen innumerables cepas que posiblemente puedan usarse en procesos de remediación, el trabajo consistirá no solo en coleccionar nuevas cepas, sino en establecer estrategias que potencien su actividad biodegradadora empezando con modificaciones en medio de cultivo hasta la adición de inductores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean dedicar este minireview a la memoria del Dr. Enrique Terrazas Siles, impulsor de la investigación en biorremediación en el IIFB usando cepas fúngicas.

REFERENCIAS

- Alexander, M. (1999) Biodegradation and Biorremediation. 2ed. Academic press, Inc. San Diego pp. 89.
- Axelsson, J., Nilsson, U., Terrazas, E., Alvarez, T., y Welander, U. (2006). Decolorization of the textile dyes Reactive Red2 and Reactive Blue 4 using *Bjerkandera* sp. strain BOL 13. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:32-37.
- Borchert, M. y Libra, J. (2001) Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 75(3): 313-321.
- Bumpus, J., Tien, M., Wright, D. y Aust, S. (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*. 228(4706):1434-1436.
- Chuquimia, E. (2002) Estudio de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos derivados del petróleo a partir de muestras contaminadas provenientes de la región altiplánica de Bolivia. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Chung, K. y Stevens Jr, S. (1993). Decolorization of Azo Dyes by Environmental and Helminthe. *Environmental and Toxicological Chemistry*. 12, 2121-2132 (1993).
- Cripps, C., Bumpus, J. y Aust, S. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(4): 1114-1118.
- Eichlerova, I., Homolka, L. y Nerud, F. (2007). Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes and Pigments*. 75(1):38-44.
- Ibrahim, V., Mendoza, L., Mamo, G. y Hattikaul, R. (2011). Laccase mediator system for activation of agarose gel: application for immobilization of proteins. *Process Biochemistry*. 46:379-384.
- Lacayo, M., Terrazas, E., van Bert, B. y Mattiasson, B. (2006). Degradation of toxaphene by *Bjerkandera* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71:549-554. doi: 10.1007/s00253-005-0174-8

- Lacayo, M. (2005) Microbial degradation of toxaphene. Tesis de doctorado. Universidad de Lund. Lund-Suecia.
- Leena, R. y Selva, R. (2008) Bio-decolourization of textile effluent containing Reactive Black-B by effluent-adapted and non-adapted bacteria. *African Journal of Biotechnology* 7 (18):3309-3313.
- Mendoza, L., Jonstrup, M., Hatti-Kaul, R. y Mattiasson, B. (2011). Azo dye decolorization by a laccase/mediator system in a membrane reactor: Enzyme and mediator reusability. *Enzyme and Microbial Technology*. 49(5):478-84. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.08.006
- Mendoza, L., Mamo, G., Ninoska, F., Gimenez, A., Hatti-Kaul, R. (2011). Blue laccase from *Galerina* sp.: properties and potential for Kraft lignin demethylation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68:270-274.
- Mendoza, L. (2011) Laccases from new fungal sources and some promising applications. Tesis de doctorado. Universidad de Lund. Lund-Suecia.
- Mendoza, L. (2004) Producción de enzimas lignilíticas y consumo de antraceno, fenantreno y benzopireno por 2 especies de basidiomicetes. Tesis de maestría. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Ontiveros, P. (2011) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en el Altiplano, aplicación de la técnica de landfarming a escala de laboratorio. Tesis de licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Pointing, S. (2001) Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:20-33.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. y Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 77(3):247-255.
- Salas, D., Morales, I. Isabel. y Terrazas, E. (2012). Capacidad decolorativa de *Coriolopsis polyzona*, *Pycnoporus* sp. y *Penicillium* sp. sobre Reactive Black 5 a diferentes condiciones de cultivo. *Biofarbo*. 20(1): 41-48.
- Salas, D., Morales, I. Isabel. y Terrazas, E. (2013). Evaluation of the genotoxic potential of reactive black solutions subjected to decolorizing treatments by three fungal strains. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 89: 125-129.
- Soares, A., Jonasson, K., Terrazas, E., Guieysse B. y Mattiasson, B. (2005). The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 719-725. doi: 10.1007/s00253-004-1747-7
- Soares, A. (2005) Biodegradation of the Recalcitrant Endocrine Disruptor Nonylphenol. Tesis de doctorado. Universidad de Lund. Lund-Suecia.
- Terrazas, E., Torrez, G., Cárdenas, P., Cabero, K., Torrico, D. y Alvarez, T. (2010). En Mónica Navia (Ed.) Proyectos de innovación productiva y tecnológica para el departamento de La Paz (pp.19-30) La Paz: Plural editores.
- Terrazas, E., Alvarez, T. Guieysse, B. y Mattiasson, B. (2005). Isolation and characterization of a white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain capable of oxidizing phenantrene. *Biotechnology Letters*. 27: 845-851. doi: 10.1007/s10529-005-6242-4.
- Terrazas, E. (2005) Fungal redox enzymes involved in the oxidation of organic pollutants. Tesis de doctorado. Universidad de Lund.
- Terrazas, E., Alvarez, T., Mendoza, L., Giménez, A. y Mattiasson, B. (2005) Characterization of *Fusarium* sp. strain BOL35 as *Fusarium santarosense* sp.nov. isolated in the Bolivian jungle and its ability to remove benzo[a]pyrene in oil polluted soil. Manuscrito.
- Torrez, G., Cardenas, O., Cabero, K., Torrico, D., Alvarez, T., y Terrazas, E. (2010). Bios-toning de material textil por acción enzimática de celulasas producidas por la cepa IB-105. *Biofarbo*. 18(1):1-12.