

## Estudio de la adaptabilidad de *Bjerkandera* a la presencia de EDTA y su efecto sobre la ecotoxicidad del sistema

Yonni, F.<sup>(i)</sup>; Fasoli, H.<sup>(i)</sup>; Leis, A.S.<sup>(i)</sup>; Alvarez, H.<sup>(ii)</sup>; Chaile, M.V..<sup>(i)</sup>

<sup>(i)</sup>Laboratorio de Química. Escuela Superior Técnica "Grl. Div. Manuel N. Savio". Cabildo 15. (1426) Buenos Aires Argentina

<sup>(ii)</sup>INTI-Textiles

### Introducción

El EDTA, es un importante agente quelante usado industrialmente (por ejemplo en las industrias textiles, papeleras y metalurgias) por su capacidad a formar complejos muy estables con iones metálicos di y trivalentes, por lo que frecuentemente es posible encontrarlo en distintos efluentes industriales complejoado principalmente con los siguientes cationes:  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . Esto ha dado como resultado la detección de diferentes compuestos recalcitrantes de éste quelante en sistemas de agua dulce, en concentraciones que van desde los 10  $\mu g/L$  hasta 100  $\mu g/L$ , los que dada su elevada persistencia en la naturaleza y su elevada biotoxicidad generan condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo de los microorganismos existentes en dicho hábitat<sup>(1)</sup>.

Teniendo en cuenta que los hongos de putrefacción blanca han sido propuestos para la biodegradación de un amplio espectro de contaminantes ambientales xenobióticos que pueden utilizar como única fuente de carbono y energía<sup>(2)</sup>, esta investigación sostiene la hipótesis de que la cepa de hongo ligninolítico de putrefacción blanca *Bjerkandera* podría ser considerada como una potencial alternativa para ser utilizada en los tratamientos biológicos de efluentes industriales que contienen iones metálicos di y trivalentes complejados con EDTA.

El objeto del presente estudio es analizar un medio nutritivo mineral, el efecto del agregado de distintas concentraciones de EDTA sobre el accionar de *Bjerkandera* frente a Poly R-478 (sustrato de referencia), y determinar bajo estas condiciones el efecto de su proceso degradativo sobre la ecotoxicidad del sistema.

### Metodología / Descripción Experimental

*Bjerkandera* sp cepa BOS55 (ATCC 90940) fue mantenida a 4°C en cápsulas con peptona-extracto de malta y transferida para su posterior uso a cápsulas con glucosa-extracto de malta<sup>(3)</sup>. Las cápsulas fueron incubadas en estufa a 26°C durante 7 días.

Los ensayos se realizaron sembrando un plug de *Bjerkandera*

(5 mm de diámetro) sobre 10 mL de medio mineral líquido (MML) definido por Tien y Kirk<sup>(4)</sup> contenido en frascos de cultivo de 100 mL de capacidad. Al medio se le ha adicionado 0,02% del colorante polimérico Poly R-478 y solución 0.01M de EDTA, en cantidad necesaria para que su concentración final sea 0.1, 10 y 100 mg/L en EDTA. Finalmente, se ha añadido 10 mL/L de tiamina (200 ppm) filtrada con un filtro estéril (Sterivex-GV de 0.22  $\mu m$ ) sobre el medio previamente esterilizado en el autoclave.

El sistema fue luego incubado en forma estática en estufa a 26°C durante 11 días.

La presencia de Poly R-478 en el MML, se siguió espectrométricamente con un espectrómetro Shimadzu MultiSpec-1501 UV-Vis (ESMS-1501) durante los 11 días de duración del ensayo. La medición se efectuó a 350 y 520 nm, sobre alícuotas de 0.2 mL de muestra diluidas a 1mL con agua destilada y centrifugadas a 2000 rpm. Su decoloración se cuantificó a través de la relación de absorbancia  $A_{350}/A_{520}$ .

Luego de 11 días de crecimiento del micelio en el MML se determinó la actividad peroxidasa, la biomasa producida y la ecotoxicidad del medio.

La actividad MnP fue monitoreada espectrométricamente (con un ESMS-1501) a 460 nm sobre alícuotas de 0.9 mL de muestra a través de la oxidación de 2,6-dimetoxifenol según el método de Paszczyński<sup>(6)</sup>.

La biomasa del micelio fue determinada gravimétricamente por la técnica del peso seco. Para ello la biomasa fue separada del medio de cultivo por filtración a través de filtros de microfibras de vidrio (Schleider & Schuell GF50) previamente tarados, luego fue lavada dos veces con 10 mL de agua destilada caliente y secada en estufa a 80°C durante 6 h.

La ecotoxicidad del medio se determinó a través de la dosis letal 50 (DL50) en *Daphnia Magna* (calculada con Trimmed Spearman-Kärber Method<sup>(5)</sup>), antes y luego de los 11 días de incubación del micelio (en 9 replicas de 5 individuos cada una), sobre 10 mL de muestra o 10 mL de muestras diluidas 7:10 o 4:10.

## Resultados

Los valores medios de la relación de absorbancia a 350 nm y 520 nm determinados sobre el medio mineral durante la incubación de *Bjerkandera* muestran (ver Fig.1) que hasta los 100 mg/L de EDTA no se observan diferencias significativas ( para un  $\alpha < 0.05$ , determinado según el Software GraphPad Prism. versión 4.0) en la decoloración del sistema con respecto a la muestra control (con 0 mg/L de EDTA).

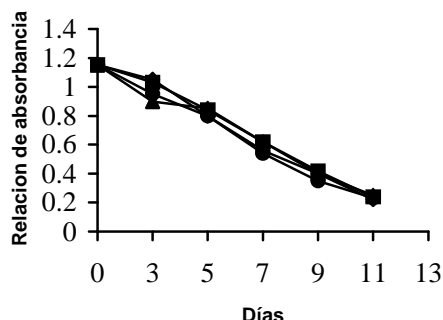


Fig. 1: Valores medios de la Relación de absorbancia ( $A_{520}/A_{350}$ ) vs tiempo para la decoloración de Poly-R 478 en medio mineral a diferentes concentraciones de EDTA (-●-0; -◆-1; -◇-10; -χ-100 mg/L).

Los valores mostrados en la Tabla I indican que la presencia de EDTA en el medio mineral no ha afectado el comportamiento de *Bjerkandera* en relación a la muestra control (0 mg/L de EDTA) en cuanto a su actividad peroxidasa y a la biomasa desarrollada durante los 11 días de duración del ensayo.

Tabla I. Actividad MnP y peso seco de *Bjerkandera* luego de 11 días de incubación a 26°C.

EDTA (mg/L)	Act. MnP (UE/L)	Peso seco (mg)
0	58.9 ± 7.2	55.9 ± 5.0
1	54.6 ± 6.5	58.1 ± 4.8
10	61.0 ± 8.2	53.9 ± 6.1
100	54.0 ± 9.2	53.5 ± 5.2

En cuanto a la ecotoxicidad del medio los valores parciales de DL50 obtenidos para *Daphnia magna*, parecen sugerir que el incremento de la concentración de EDTA, en el medio mineral At = 0 ( antes de la inoculación del sistema con *Bjerkandera* ) y luego de 11 días de inoculación ( en presencia de *Bjerkandera* ) no provoca un incremento significativo en la ecotoxicidad del sistema. En relación a este resultado es necesario reconocer que dado la variabilidad propia del método de ensayo, abría que incrementar el número de pruebas efectuadas para lograr una confirmación de los datos obtenido, los que no pudieron ser presentados en este trabajo

debido a la limitación de tiempo.

## Conclusiones

El agregado de hasta 100 mg/L de EDTA (valor éste 10 veces superior al informado por Kari y Giger como valor medio hallado en plantas tratamiento de aguas residuales<sup>(7)</sup>) al medio mineral no ejerce efecto tóxico sobre *Bjerkandera*. Esto sugiere que los complejos metálicos formados a partir de los iones presentes en el medio mineral definido por Tien y Kirk ( principalmente CuII EDTA, Zn EDTA, Co EDTA y FeII EDTA ) no alteran ni el crecimiento ni la actividad degradativa de esta especie de hongo ligninolítico.

Por lo expuesto hemos demostrado que la hipótesis planteada al inicio de éste trabajo se sostendría, por lo que *Bjerkandera* podría ser considerada como una potencial alternativa para ser utilizada en los tratamientos biológicos de efluentes industriales que contienen complejos metálicos de EDTA..

## Referencias

- [1] A.D. Satroutdinov, E.G. Dedyukhina, T.I. Chistyakova, M. Witschel, I.G. Minkevich, V.K. Eroshin, T. Egli "Degradation of Metal-EDTA complexes by resting cells of the Bacterial Strain DSM 9103" *Environ Sci Technol* (2000) 34: 1715-1720.
- [2] M. J. Field, E.Jong, G. Feijoo Costa, J.A.M. Bont "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi" *Appl Environ Microbiol* (1992) 58: 2219- 2226.
- [3] T. Mester, E. Jong, J.A. Field " Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase" *Appl Environ Microbiol* (1995) 61: 1881-1887
- [4] M. Tien, T.K. Kirk " Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*", *Methods Enzymol.* (1988) 161: 238-248.
- [5] M.A. Hamilton, R.C. Russo, R.V. Thurston "Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays" (1978) *Environ Sci Technol* 11(7): 714-719; correction 12(4): 417
- [6] A. Paszczyński, R.L. Crawford, V. Huynh G. Schuster, " Manganese peroxidase of *Phanerochaete Chrysosporium*: purification ", *Methods in Enzymology*, (1988). Vol 161, 264-270.
- [7] F.G. Kari, W. Giger, " Modeling the photochemical dation of EDTA in the River Glatt", *Environ. Sci. Technol.* ( 1996) 29: 2814-2827

Para mayor información contactarse con:  
nombre del autor de contacto -jhoracio@inti.gov.ar

## Estudio de la adaptabilidad de *Bjerkandera* a la presencia de EDTA y su efecto sobre la ecotoxicidad del sistema

Yonni, F.<sup>(i)</sup>; Fasoli, H.<sup>(i)</sup>; Leis, A.S.<sup>(i)</sup>; Alvarez, H.<sup>(ii)</sup>; Chaile, M.V..<sup>(i)</sup>

<sup>(i)</sup>Laboratorio de Química. Escuela Superior Técnica "Grl. Div. Manuel N. Savio". Cabildo 15. (1426) Buenos Aires Argentina

<sup>(ii)</sup>INTI-Textiles

### Introducción

El EDTA, es un importante agente quelante usado industrialmente (por ejemplo en las industrias textiles, papeleras y metalurgias) por su capacidad a formar complejos muy estables con iones metálicos di y trivalentes, por lo que frecuentemente es posible encontrarlo en distintos efluentes industriales complejoado principalmente con los siguientes cationes:  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . Esto ha dado como resultado la detección de diferentes compuestos recalcitrantes de éste quelante en sistemas de agua dulce, en concentraciones que van desde los 10  $\mu\text{g/L}$  hasta 100  $\mu\text{g/L}$ , los que dada su elevada persistencia en la naturaleza y su elevada biotoxicidad generan condiciones ambientales desfavorables para el desarrollo de los microorganismos existentes en dicho hábitat<sup>(1)</sup>.

Teniendo en cuenta que los hongos de putrefacción blanca han sido propuestos para la biodegradación de un amplio espectro de contaminantes ambientales xenobióticos que pueden utilizar como única fuente de carbono y energía<sup>(2)</sup>, esta investigación sostiene la hipótesis de que la cepa de hongo ligninolítico de putrefacción blanca *Bjerkandera* podría ser considerada como una potencial alternativa para ser utilizada en los tratamientos biológicos de efluentes industriales que contienen iones metálicos di y trivalentes complejados con EDTA.

El objeto del presente estudio es analizar un medio nutritivo mineral, el efecto del agregado de distintas concentraciones de EDTA sobre el accionar de *Bjerkandera* frente a Poly R-478 (sustrato de referencia), y determinar bajo estas condiciones el efecto de su proceso degradativo sobre la ecotoxicidad del sistema.

### Metodología / Descripción Experimental

*Bjerkandera* sp cepa BOS55 (ATCC 90940) fue mantenida a 4°C en cápsulas con peptona-extracto de malta y transferida para su posterior uso a cápsulas con glucosa-extracto de malta<sup>(3)</sup>. Las cápsulas fueron incubadas en estufa a 26°C durante 7 días.

Los ensayos se realizaron sembrando un plug de *Bjerkandera*

(5 mm de diámetro) sobre 10 mL de medio mineral líquido (MML) definido por Tien y Kirk<sup>(4)</sup> contenido en frascos de cultivo de 100 mL de capacidad. Al medio se le ha adicionado 0,02% del colorante polimérico Poly R-478 y solución 0.01M de EDTA, en cantidad necesaria para que su concentración final sea 0.1, 10 y 100 mg/L en EDTA. Finalmente, se ha añadido 10 mL/L de tiamina (200 ppm) filtrada con un filtro estéril (Sterivex-GV de 0.22  $\mu\text{m}$ ) sobre el medio previamente esterilizado en el autoclave.

El sistema fue luego incubado en forma estática en estufa a 26°C durante 11 días.

La presencia de Poly R-478 en el MML, se siguió espectrométricamente con un espectrómetro Shimadzu MultiSpec-1501 UV-Vis (ESMS-1501) durante los 11 días de duración del ensayo. La medición se efectuó a 350 y 520 nm, sobre alícuotas de 0.2 mL de muestra diluidas a 1mL con agua destilada y centrifugadas a 2000 rpm. Su decoloración se cuantificó a través de la relación de absorbancia  $A_{350}/A_{520}$ .

Luego de 11 días de crecimiento del micelio en el MML se determinó la actividad peroxidasa, la biomasa producida y la ecotoxicidad del medio.

La actividad MnP fue monitoreada espectrométricamente (con un ESMS-1501) a 460 nm sobre alícuotas de 0.9 mL de muestra a través de la oxidación de 2,6-dimetoxifenol según el método de Paszczyński<sup>(6)</sup>.

La biomasa del micelio fue determinada gravimétricamente por la técnica del peso seco. Para ello la biomasa fue separada del medio de cultivo por filtración a través de filtros de microfibras de vidrio (Schleider & Schuell GF50) previamente tarados, luego fue lavada dos veces con 10 mL de agua destilada caliente y secada en estufa a 80°C durante 6 h.

La ecotoxicidad del medio se determinó a través de la dosis letal 50 (DL50) en *Daphnia Magna* (calculada con Trimmed Spearman-Kärber Method<sup>(5)</sup>), antes y luego de los 11 días de incubación del micelio (en 9 replicas de 5 individuos cada una), sobre 10 mL de muestra o 10 mL de muestras diluidas 7:10 o 4:10.

## Resultados

Los valores medios de la relación de absorbancia a 350 nm y 520 nm determinados sobre el medio mineral durante la incubación de *Bjerkandera* muestran (ver Fig.1) que hasta los 100 mg/L de EDTA no se observan diferencias significativas (para un  $\alpha < 0.05$ , determinado según el Software GraphPad Prism, versión 4.0) en la decoloración del sistema con respecto a la muestra control (con 0 mg/L de EDTA).

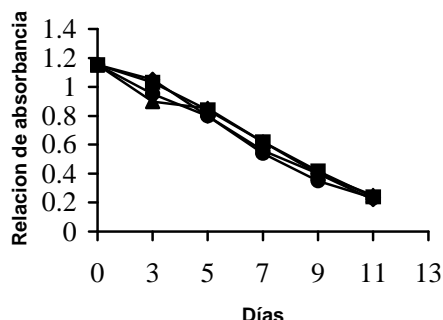


Fig. 1: Valores medios de la Relación de absorbancia ( $A_{520}/A_{350}$ ) vs tiempo para la decoloración de Poly-R 478 en medio mineral a diferentes concentraciones de EDTA (-●-0; -◆-1; -◇-10; -χ-100 mg/L).

Los valores mostrados en la Tabla I indican que la presencia de EDTA en el medio mineral no ha afectado el comportamiento de *Bjerkandera* en relación a la muestra control (0 mg/L de EDTA) en cuanto a su actividad peroxidasa y a la biomasa desarrollada durante los 11 días de duración del ensayo.

Tabla I. Actividad MnP y peso seco de *Bjerkandera* luego de 11 días de incubación a 26°C.

EDTA (mg/L)	Act. MnP (UE/L)	Peso seco (mg)
0	58.9 ± 7.2	55.9 ± 5.0
1	54.6 ± 6.5	58.1 ± 4.8
10	61.0 ± 8.2	53.9 ± 6.1
100	54.0 ± 9.2	53.5 ± 5.2

En cuanto a la ecotoxicidad del medio los valores parciales de DL50 obtenidos para *Daphnia magna*, parecen sugerir que el incremento de la concentración de EDTA, en el medio mineral At = 0 (antes de la inoculación del sistema con *Bjerkandera*) y luego de 11 días de inoculación (en presencia de *Bjerkandera*) no provoca un incremento significativo en la ecotoxicidad del sistema. En relación a este resultado es necesario reconocer que dado la variabilidad propia del método de ensayo, habría que incrementar el número de pruebas efectuadas para lograr una confirmación de los datos obtenidos, los que no pudieron ser presentados en este trabajo

debido a la limitación de tiempo.

## Conclusiones

El agregado de hasta 100 mg/L de EDTA (valor éste 10 veces superior al informado por Kari y Giger como valor medio hallado en plantas tratamiento de aguas residuales<sup>(7)</sup>) al medio mineral no ejerce efecto tóxico sobre *Bjerkandera*. Esto sugiere que los complejos metálicos formados a partir de los iones presentes en el medio mineral definido por Tien y Kirk (principalmente CuII EDTA, Zn EDTA, Co EDTA y FeII EDTA) no alteran ni el crecimiento ni la actividad degradativa de esta especie de hongo ligninolítico.

Por lo expuesto hemos demostrado que la hipótesis planteada al inicio de éste trabajo se sostendría, por lo que *Bjerkandera* podría ser considerada como una potencial alternativa para ser utilizada en los tratamientos biológicos de efluentes industriales que contienen complejos metálicos de EDTA.

## Referencias

- [1] A.D. Satroutdinov, E.G. Dedyukhina, T.I. Chistyakova, M. Witschel, I.G. Minkevich, V.K. Eroshin, T. Egli "Degradation of Metal-EDTA complexes by resting cells of the Bacterial Strain DSM 9103" *Environ Sci Technol* (2000) 34: 1715-1720.
- [2] M. J. Field, E. Jong, G. Feijoo Costa, J.A.M. Bont "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi" *Appl Environ Microbiol* (1992) 58: 2219- 2226.
- [3] T. Mester, E. Jong, J.A. Field " Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase" *Appl Environ Microbiol* (1995) 61: 1881-1887
- [4] M. Tien, T.K. Kirk " Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*", *Methods Enzymol.* (1988) 161: 238-248.
- [5] M.A. Hamilton, R.C. Russo, R.V. Thurston "Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays" (1978) *Environ Sci Technol* 11(7): 714-719; correction 12(4): 417
- [6] A. Paszczyński, R.L. Crawford, V. Huynh G. Schuster, " Manganese peroxidase of *Phanerochaete Chrysosporium*: purification ", *Methods in Enzymology*, (1988). Vol 161, 264-270.
- [7] F.G. Kari, W. Giger, " Modeling the photochemical dation of EDTA in the River Glatt", *Environ. Sci. Technol.* ( 1996) 29: 2814-2827

Para mayor información contactarse con:  
nombre del autor de contacto -jhoracio@inti.gov.ar