

Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*

Margarita María Lopera Mesa*, Gustavo Antonio Peñuela Mesa**,
María Carolina Domínguez Gual*** y Gloria María Mejía Zapata***

(Recibido el 28 de junio de 2004. Aceptado el 28 de septiembre de 2004)

Resumen

Se evaluó la degradación del insecticida clorpirifos en muestras de suelo durante 21 días, utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. En los ensayos se obtuvieron porcentajes de degradación, en promedio, para las muestras con hongo, de 96,3, 82,4 y 62,2% cuando se trabajaron, respectivamente, con concentraciones iniciales de clorpirifos de 0,95, 5,3 y 9,4 µg/g. Igualmente, los porcentajes de degradación estuvieron acompañados del aumento en la velocidad de degradación, cuando se partió de la concentración inicial de 0,95 µg/g.

----- *Palabras clave:* degradación, pesticidas, insecticidas, organofosforados, clorpirifos, *Phanerochaete chrysosporium*, hongos, ligninolíticos, suelos.

Laboratory studies of the degradation of chlorpyrifos pesticide in soils supplemented by the fungus *phanerochaete chrysosporium*

Abstract

Degradation of the insecticide chlorpyrifos was investigated in sterilized soil samples supplemented by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Degradation rates were measured during 21-day incubation at pesticide concentrations of 0,95, 5,3, and 9,4 µg/g. *Phanerochaete chrysosporium* showed ability to biodegrade the insecticide in values of 96,3%, 82,4% and 62,2%, respectively, followed by rapid degradation at low initial concentration of chlorpyrifos.

----- *Key words:* degradation, insecticide, pesticide, chlorpyrifos, white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, soils.

* Estudiante de la Maestría en Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. albpj@epm.net.co.

** Doctor en Química Ambiental. Docente de la Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

*** Investigadora. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Introducción

Los sistemas de producción agrícola tradicional en Colombia han estado acompañados del uso indiscriminado de plaguicidas altamente tóxicos como los organofosforados y los organoclorados, lo que ha llevado a la contaminación de los recursos naturales y al deterioro de los ecosistemas y de la calidad de vida de las personas.

El clorpirifos es un insecticida organofosforado, que ha sido considerado como uno de los más utilizados en el mundo y en Colombia para el control de plagas de cultivos de flores, banano y hortalizas. Igualmente, es catalogado como un compuesto tóxico para la fauna terrestre y acuática, y para las personas [1]. Además, dicho plaguicida puede almacenarse en el suelo desde cinco días hasta veinte años [1, 2] dependiendo de su concentración, el tipo de suelo y las condiciones ambientales existentes. Específicamente, en el departamento de Antioquia se ha encontrado el clorpirifos en concentraciones de 0,25 $\mu\text{g/g}$ de suelo, lo cual representa un riesgo para los microorganismos del suelo y para los habitantes de la región [3].

Nuestro grupo de investigación de la Universidad de Antioquia, pensando en el problema del deterioro del suelo, ha seleccionado la técnica de biorremediación, como una alternativa de bajo costo y amigable con el ambiente que puede solucionar o mitigar los impactos ambientales ocasionados por la contaminación con plaguicidas. La biorremediación es una propuesta de depuración de suelos, aguas y aire, basada en el uso de organismos como plantas, hongos y bacterias, que logra degradar los contaminantes hasta las formas químicas de dióxido de carbono y agua, y disminuir los efectos causados al ambiente por la contaminación.

Uno de los microorganismos más estudiados en la biorremediación, es el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el cual es un basidiomiceto también denominado el hongo de la pudrición blanca, que por su capacidad ligninolítica ha sido probado para la degradación de gran variedad de compuestos como hidrocarburos, compuestos

aromáticos clorados, compuestos fenólicos, insecticidas y fungicidas, entre otros, encontrando excelentes resultados y logrando en muchos casos la mineralización de los compuestos. Con esta investigación se pretende desarrollar la primera fase de un proyecto de biorremediación, la cual está orientada a la evaluación de la inhibición del crecimiento del hongo a diferentes concentraciones del plaguicida clorpirifos y a la medición en el laboratorio de porcentajes de degradación del plaguicida que permitan, posteriormente, diseñar estrategias de biorremediación de suelos para zonas agrícolas.

Metodología

Diseño experimental

Análisis de la varianza (ANOVA)

Para evaluar la degradación del plaguicida efectuada por el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, se hicieron tres ensayos mensuales (y_1 , y_2 y y_3) siguiendo las directrices de un diseño anidado conformado por dos niveles:

Nivel 1. Días de muestreo (t_0 , t_1 , t_2 y t_3) en cada uno de los ensayos de degradación. Cabe anotar que estos tiempos de muestreo corresponden a los días 0, 7, 14 y 21 de cada ensayo.

Nivel 2: Tratamientos (controles y muestras).

Igualmente, con este diseño se probaron las siguientes hipótesis:

$H_0: \sigma^2 = 0$ contra $H_1: \sigma^2 > 0$, al rechazar H_0 se concluye que hay variación significativa de las muestras en el mismo tratamiento sea un control o una muestra con hongo.

$H_0: \bar{x}_i = 0$ contra $H_1: \bar{x}_i \neq 0$, esta hipótesis prueba igualdad de promedios de días de muestreo en cada ensayo.

Para ambas pruebas se asumió una probabilidad del error $\alpha = 0,05$ y un valor de $p < 0,05$ y los datos obtenidos en esta investigación fueron evaluados con el paquete estadístico Stat Graphics.

Cabe anotar que las hipótesis formuladas fueron evaluadas utilizando el coeficiente F de acuerdo con lo planteado por Díaz [4].

Análisis multivariante de la varianza (MANOVA)

El segundo paso en la propuesta estadística de esta investigación fue la realización de un análisis multivariante de la varianza (MANOVA) con el objeto de contrastar la significación estadística de las diferencias entre las medias de los tres ensayos y_1 , y_2 y y_3 .

Las hipótesis de este análisis fueron planteadas como vectores de medias e involucraron dos factores, buscando comparar el vector promedio con un vector de constantes (la mayoría de las veces el vector de ceros) siendo:

H_0 : El cambio en los niveles del factor no produce efectos en las respuestas.

H_1 : El cambio en los niveles del factor produce efecto en al menos una respuesta.

Para determinar si el modelo estimado fue adecuado para describir los datos, es decir establecer si las hipótesis e intervalos de confianza utilizados fueron confiables para la inferencia, se efectuaron gráficos de residuales y pruebas de normalidad, multinormalidad y varianza constante, linealidad, diagnósticos de datos influenciales y de multicolinealidad [5, 6, 7, 8, 9].

Para las pruebas anteriores se asumió una probabilidad del error $\alpha = 0,05$, un valor de $p < 0,05$ y se utilizó el paquete estadístico Stat Graphics.

Evaluación de la inhibición del crecimiento del hongo

Antes de iniciar los procesos de degradación del plaguicida en el suelo, se hicieron ensayos de inhibición del crecimiento del hongo en cajas de petri con medio Sabureau a doce concentraciones de clorpirifos.

En total se prepararon 13 muestras (una de ellas representó el control) con dos repeticiones cada

una, las cuales contenían 22 mL de agar Sabureau, 10 mL de agua destilada y autoclavada con concentraciones de 480, 400, 200, 100, 50, 9, 6, 3, 0,9, 0,6, 0,3 y 0,1 mg/L de clorpirifos y una pequeña porción del hongo cultivado de forma superficial sobre cada caja. Dichas muestras se dejaron incubando 8 días a una temperatura de 37 °C para posteriormente evaluar visualmente el crecimiento del hongo a las diferentes concentraciones de clorpirifos.

Evaluación de la degradación del clorpirifos

Las muestras de suelo involucradas en el proceso de degradación fueron recogidas del campo y llevadas al laboratorio; seguidamente se secaron al aire durante dos días, y se pasaron por un tamiz de malla 2 mm antes de colocarlas en una estufa a 100 °C durante 24 horas para eliminar el contenido de humedad.

El suelo utilizado en los ensayos presentó textura arcillo-arenosa, con conductividad eléctrica de 0,516 dS/m, capacidad de intercambio catiónico de 13,74 meq/100 g de suelo, porcentaje de materia orgánica de 7,83 y pH de 6,1.

Asimismo, con el objeto de identificar el verdadero efecto del hongo sobre el plaguicida, las muestras empleadas para el proceso de degradación se dividieron en dos grandes grupos: los controles y las muestras con hongo.

Los controles se prepararon con 10 g de suelo, 5 de mazorca triturada (soporte), 5 mL de agua y 5 mL de solución acuosa con clorpirifos. Las muestras con hongo contenían los mismos componentes de los controles con la diferencia que, a dichas muestras, se les adicionaron 5 mL de medio Kirk [10] cultivado con *P. chrysosporium*.

En cuanto a la concentración de clorpirifos utilizada en cada uno de los ensayos, se debe anotar que para el ensayo 1 se trabajó con una concentración inicial de 0,95 $\mu\text{g/g}$, para el ensayo 2 de 5,3 y para el 3 de 9,4.

Además, antes de la adición de la solución acuosa de clorpirifos y de su inoculación, las muestras

fueron autoclavadas durante 20 minutos a 259 °F y 20 psi, con el fin de evitar interferencias en el proceso de degradación por contaminación con los microorganismos del ambiente.

Luego las muestras se incubaron a 37 °C sin agitación y con el objeto de efectuar la extracción del plaguicida y cuantificar su degradación se tomaron tres muestras con hongo y tres controles cada 7 días, es decir, partiendo del día de la inoculación, a los 0, 7, 14 y 21 días.

Extracción del clorpirifos

Para extraer el clorpirifos de las muestras se agregó a las muestras con hongo y a los controles, 35 mL de una mezcla formada por hexano (grado cromatográfico) acetona (grado cromatográfico) en una relación 1:1, se taparon herméticamente y agitaron a temperatura ambiente durante 12 horas a 240 rpm. Luego por decantación en probeta se separó la fase orgánica, se midió su volumen y se tomaron 250 µL de fase orgánica y se cuantificó su clorpirifos por cromatografía de gases.

Cuantificación del clorpirifos presente en las muestras

Para calcular la cantidad de clorpirifos presente en la fase orgánica, luego de cada tratamiento, se tomó un volumen determinado de la fase orgánica y se diluyó en una mezcla de acetato de etilo-hexano 1:1 y se inyectó un microlitro al cromatógrafo de gases.

Los análisis cromatográficos se realizaron con un cromatógrafo de gases Agilent technologies 6890, equipado con un detector de microcaptura de electrones y una columna Hewlet Packard 5 (30 m x 220 µm x 0,25 µm). El horno se programó de 60 a 240 °C, con un primer gradiente de 20 °C/min de 60 a 200 °C y un segundo gradiente de 10 °C/min de 200 a 240 °C, manteniendo dos minutos la temperatura a 240 °C. El gas portador fue el helio a 4 mL/min y las temperaturas del inyector y del detector fueron 290 y 350 °C respectivamente. Las muestras se inyectaron manualmente, en modo *splitless* en un volumen de 1 µL. El

inyector trabajó a una presión de 20,49 psi y el *Make Up* del detector fue nitrógeno con un flujo de 45 mL/min.

La ecuación de la curva de calibración fue

$$Y = 187108 X + 1249,7 \text{ con } R^2 = 0,981$$

Donde,

Y = Área en el cromatógrafo.

X = Concentración de clorpirifos en mg/L.

Por último, como se sugiere [11], los porcentajes de recuperación del clorpirifos (%R), se calcularon comparando la cantidad inicial adicionada a las muestras y a los controles, con la cuantificada luego de los ensayos de degradación:

$$\%R = CL \times 100 / Ci$$

Donde,

CL = Concentración luego de la degradación.

Ci = Concentración inicial de clorpirifos.

Resultados y análisis de resultados

Inhibición del crecimiento

Para evaluar la inhibición del crecimiento del hongo a diferentes concentraciones de clorpirifos, las muestras fueron incubadas por ocho días, como se indicó en la parte metodológica de esta investigación; encontrando que *P. Chrysosporium* crece en agar Sabureau y agua en concentraciones de clorpirifos que variaron entre 0,1 y 480 mg/L. Esta evaluación se efectuó de forma visual, notando que el hongo no presentó cambio de coloración a altas concentraciones.

Evaluación de la extracción del plaguicida en el suelo

En los ensayos de degradación del clorpirifos, se encontró en la semana cero de los tres ensayos (véanse figuras 1, 2 y 3) el 73,42% de extracción en promedio para los controles y para las muestras con hongo el 82,38%. Estos valores

según lo reportado en la literatura son óptimos entendiendo que los procesos de extracción por agitación mecánica de plaguicidas en suelos son bastante complejos, pues involucran agentes como la textura del suelo, la solución compuesta por acetona, hexano, agua y minerales que se forman durante la agitación, el contenido de materia orgánica de las muestras, la temperatura del ambiente de agitación y la evaporación de los solventes, entre otros.

Por otro lado, analizando el proceso de extracción del plaguicida, fue posible notar al momento de medición de la fase orgánica (antes de la toma de muestra que se lleva al cromatógrafo) que fases orgánicas inferiores a 10 mL indican alta evaporación de solvente y por ende baja extracción de plaguicida. Por esto se sugiere para futuros proyectos que, durante el proceso de extracción se efectúe el adecuado sellado de las muestras, utilizando si es posible, tapón con esmeril en los erlenmeyers y sobre el tapón cinta de enmascarar.

Asimismo, se encontró que el hongo tiene alta capacidad de almacenar agua en su micelio; por esto para el óptimo proceso de extracción, es importante controlar el contenido de agua que se adiciona a las muestras (sin afectar el crecimiento del hongo), ya que el proceso de agitación libera

el agua almacenada y la mezcla con los solventes, especialmente con la acetona, formando una solución que afecta la extracción del plaguicida.

Por otro lado, si se observan las figuras, se tiene que a excepción de la semana cero en los ensayos 1 y 2, todos los promedios obtenidos en los controles fueron superiores a los alcanzados en las muestras con hongo, lo cual permite validar el proceso de degradación logrado, pues en este proyecto era necesario obtener diferencias significativas entre controles y muestras con hongo con el objeto de medir la verdadera acción de *P. chrysosporium* sobre el plaguicida.

Análisis estadístico de los resultados

Análisis de varianza

Inicialmente se evaluaron los supuestos del modelo del análisis de varianza, y se encontró normalidad en los residuos, independencia entre residuales y homogeneidad de varianza. Además, para el cumplimiento de los supuestos con los datos del primer ensayo, fue necesario ejecutar la transformación raíz cuadrada.

Analizando los valores de *F* y *P* del ANOVA, se encontró que se acepta la hipótesis nula propuesta en la metodología y que no existe diferencia sig-

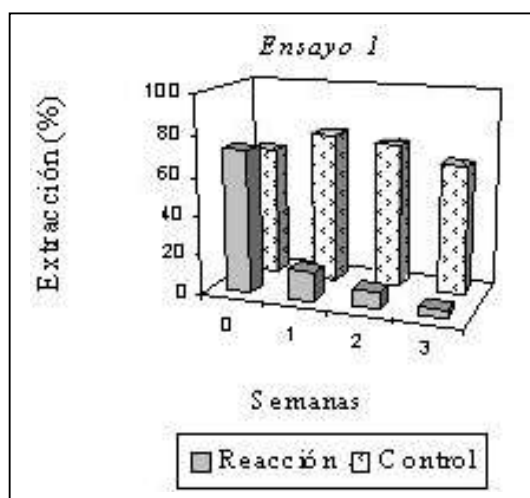


Figura 1 Extracción de clorpirifos en el ensayo 1

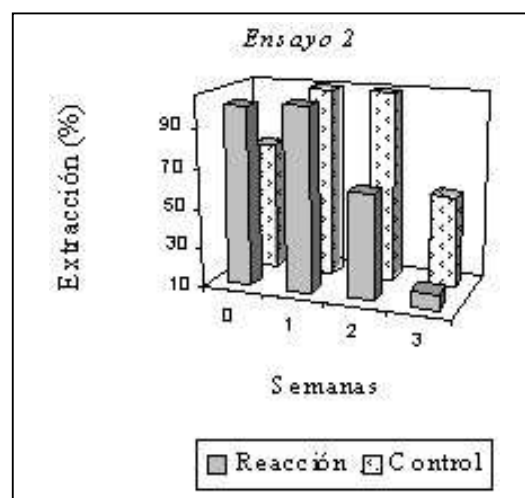


Figura 2 Extracción de clorpirifos en el ensayo 2

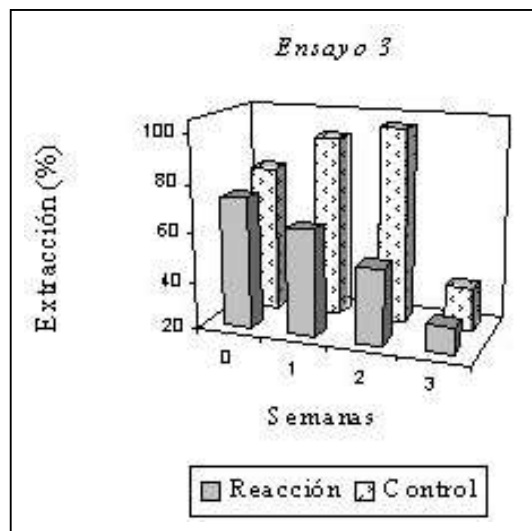


Figura 3 Extracción de clorpirifos en el ensayo 3

nificativa en los datos obtenidos semanalmente para los tres ensayos, pues los valores de F fueron menores que el teórico y los valores de P fueron mayores de 0,05.

Asimismo, los valores F del ANOVA para los porcentajes de extracción de los tratamientos, fueron mayores que el teórico y los valores de P menores de 0,05, indicando que se debe rechazar la hipótesis nula y que existe diferencia significativa entre los datos presentes en los controles y las muestras con hongo.

Este análisis permite afirmar que, estadísticamente se puede comprobar la diferencia significativa entre los datos obtenidos en los controles y muestras, evidenciando el efecto que causa la adición del hongo, sobre la disminución en la concentración de clorpirifos presente en las muestras.

Examinando los porcentajes de varianza aportados por las semanas y los tratamientos en cada uno de los ensayos se halló que, para el ensayo 1 el 93,02% del total de la variabilidad en el porcentaje de extracción fue debido a la variación entre muestras y controles, mostrando el marcado efecto que causa sobre las muestras la mezcla con el hongo. Además, se observó que existió

adecuado control de las condiciones de este ensayo pues sólo el 6,98% de la variabilidad total es debida a factores distintos a los controlables por el investigador.

Igualmente, en el ensayo 3 se notó que el 53,99% de la varianza estuvo conformada por el efecto de los tratamientos, es decir la adición del hongo, y se encontró bajo porcentaje de variabilidad, el 13,2%, generado por factores ajenos al control del experimentador.

Además, el ANOVA del ensayo 2 indicó que el 60,96% de la variación fue debida al tiempo de muestreo, en otras palabras, a medida que aumentó el tiempo de permanencia del hongo y del plaguicida en las muestras, se incrementó la degradación y la diferencia entre los porcentajes de extracción presentes en cada semana de muestreo. Por otro lado, en este análisis, al igual que en los análisis de varianza obtenidos para los ensayos 1 y 2, existió bajo porcentaje de la variabilidad (17,08%) ocasionado por factores distintos a los controlables por el investigador.

Análisis multivariante de la varianza

En la evaluación de los supuestos del MANOVA se encontró multinormalidad en los residuales y no se halló homogeneidad de matrices de covarianzas y por tal razón se utilizó el estadístico Traza de Pillai para el análisis de los resultados.

Observando el valor P del estadístico Pillai, se encontró que fue mayor a 0,05, por tanto se aceptó la hipótesis nula y se afirmó que no hay diferencia significativa entre las medias de los porcentajes de extracción presentes en las semanas de los tres ensayos.

Además, el valor de P de las medias de los tratamientos fue menor de 0,05 por tanto, se rechazó la hipótesis nula y se afirmó que existe diferencia significativa entre las medias de los porcentajes de extracción de los tratamientos en los tres ensayos.

Lo anterior indica que, el cambio en la concentración inicial de clorpirifos en cada ensayo afecta la

diferencia en el porcentaje de extracción entre los controles y las muestras con hongo, encontrando mayor degradación del plaguicida en el ensayo 1 donde se partió de una concentración inicial de clorpirifos de 0,95 µg/g.

Además, la disminución en el tiempo, de la concentración de clorpirifos en los tres ensayos, causada posiblemente por procesos de hidrólisis y evaporación en los controles y degradación enzimática en las reacciones, hace que no exista diferencia significativa entre las medias de los porcentajes de extracción medidos semanalmente.

Degradación del clorpirifos

Análisis del ensayo 1

Para analizar los porcentajes de degradación del clorpirifos es necesario de forma conjunta, observar los resultados obtenidos en los controles y las muestras con hongo pues esto demuestra el efecto real de *P. chrysosporium* sobre la degradación del clorpirifos.

En el caso del ensayo 1 se encontró que a los ocho días de incubación hubo un marcado efecto del hongo sobre el proceso de degradación del plaguicida (véase figura 4), notando en las

muestras con hongo, una disminución del 85,56% en promedio de la concentración de clorpirifos. Igualmente, los controles mostraron disminución en la concentración, pero en valores inferiores a los presentados por las reacciones, en promedio bajaron un 24,07%.

Cabe aclarar que, esta disminución en el 24,07% de la concentración del plaguicida en los controles, fue debida posiblemente a la acción de factores como evaporación e hidrólisis del plaguicida durante el proceso de incubación o agentes involucrados en la extracción como decantación y adsorción del plaguicida por partículas del suelo como arcillas y materia orgánica.

Tratando de explicar lo ocurrido químicamente en la hidrólisis del clorpirifos, es importante tener en cuenta lo planteado por Liu et al. [12], quien explica, que este plaguicida tiene tres enlaces éster susceptibles al rompimiento: dos enlaces terciarios alquil éster y un enlace éster fosfato (piridil).

Por otro lado, encontramos que en las semanas dos y tres de muestreo los porcentajes de degradación aumentaron para las muestras con hongo en 5,79 y 4,96% respectivamente, y para los controles en 3,17 y 7,33% respectivamente; logrando un porcentaje final de degradación a los 21 días

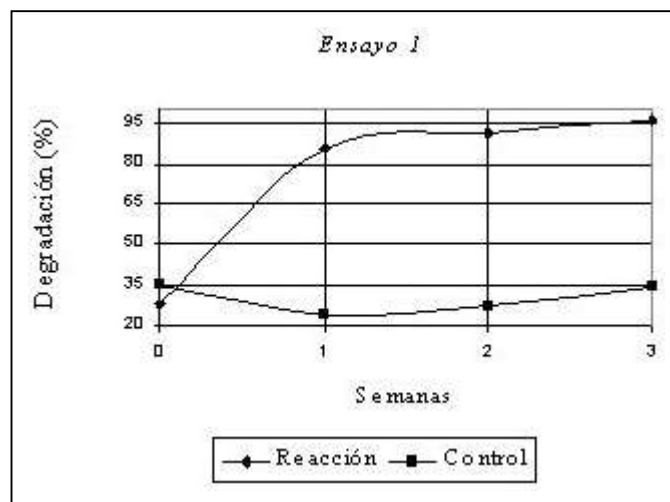


Figura 4 Promedios de degradación en el ensayo 1

de incubación de 96,31% en promedio para las muestras y 34,57% para los controles.

Lo anterior lleva a inferir que la actividad del hongo sobre el plaguicida es importante a los ocho días de degradación, posteriormente, los porcentajes de degradación se mantienen relativamente constantes, mostrando un leve ascenso en los valores obtenidos para las reacciones a los 21 días.

Igualmente, la diferencia entre los porcentajes de degradación de controles y muestras con hongo a los 21 días es de 61,74%, lo cual muestra el marcado efecto de *P. chrysosporium* sobre las muestras.

Análisis del ensayo 2

La figura 5 muestra cómo a partir de la segunda semana de incubación se observa el efecto del hongo sobre la concentración de clorpirifos, encontrando en las muestras con hongo porcentajes de degradación de 37,08% para la segunda semana y de 82,38% en promedio para la tercera.

Por su parte, los controles a diferencia del ensayo anterior, permanecieron constantes en la primera y en la segunda semana sin sufrir degradación, en la tercera semana se notó una disminución de 43,69% en promedio en la concentración. Esta disminución en la velocidad de degradación de

los controles, es probablemente explicada por la saturación de los sitios activos presentes en la arcilla del suelo a medida que aumenta la concentración de clorpirifos.

Según Racke et al. [13] existe una interacción entre las arcillas y los plaguicidas organofosforados, la cual consiste en que estas favorecen la naturaleza electrofílica del átomo del fósforo presente en la molécula, facilitando el ataque nucleofílico por parte de los iones hidróxido y su posterior degradación. Entonces a medida que aumenta la cantidad de clorpirifos en el suelo existe menor probabilidad de que este sea activado por las arcillas y luego hidrolizado en la solución del suelo.

Comparando los porcentajes de degradación alcanzados en los controles con los presentes en las muestras con hongo, se tiene que las muestras están 43,01% en la segunda y 38,69% en la tercera semana por encima de los controles, lo cual indica que la adición del hongo favorece la degradación del clorpirifos en porcentajes superiores a los generados por los agentes químicos naturales presentes en los controles, como la hidrólisis y la evaporación.

Igualmente se encuentra, que la curva de degradación del clorpirifos en las muestras es creciente y que el valor promedio obtenido en la última

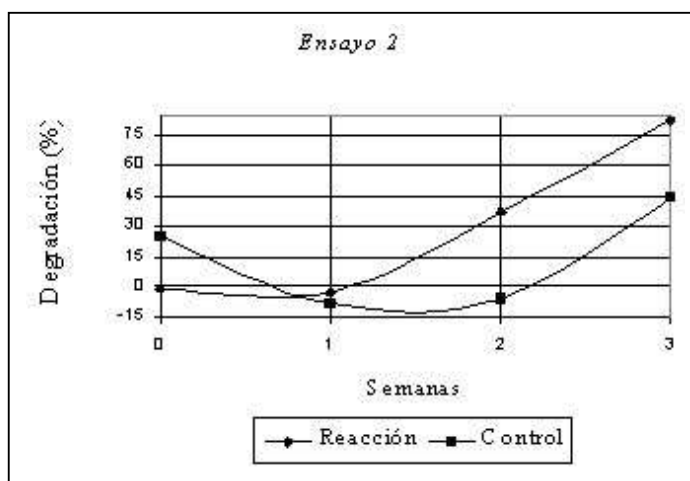


Figura 5 Promedios de degradación en el ensayo 2

semana de degradación es cercano al 85%, por tanto, se espera en corto tiempo (probablemente en un periodo no superior a ocho días) el logro de porcentajes de degradación cercanos al 100%.

Para el caso del desarrollo de una segunda fase de este proyecto, se sugiere evaluar cómo el cambio en las condiciones de cultivo del hongo, acelera el proceso de degradación. Esto puede lograrse a través de la utilización de otros soportes como viruta de madera, el aumento de la humedad (hasta un punto que no afecte la extracción del plaguicida con solventes orgánicos) y el cambio en el contenido de nutrientes del sustrato.

Análisis del ensayo 3

La figura 6 indica cómo la curva de promedios de degradación en las muestras con hongo se presenta de forma ascendente encontrando porcentajes de degradación de 35,99% para la primera semana, de 48,96 para la segunda y 69,17 para la tercera. Por su parte, los controles se mantuvieron relativamente constantes, sin presentar degradación hasta la tercera semana donde mostraron un porcentaje de 62,2%.

Según esta información tenemos, que la concentración de clorpirifos en el suelo de 10 µg/g inhibe la degradación del plaguicida en los controles debido a los procesos físico-químicos que allí operan. Igualmente se observa inhibición en la degradación en menor proporción, en las muestras lo cual se explica en parte, por la teoría de Murray et al. [14] quien propone que el TPC liberado en los procesos de degradación, afecta la acción de los microorganismos y en este caso el efecto del hongo.

Sin embargo, a pesar del efecto inhibitorio del clorpirifos en ambos tipos de muestras, se observa clara diferencia entre los porcentajes de degradación presentes tanto en las muestras como en controles, lo cual fue posible comprobarlo con el análisis estadístico, el cual probó diferencia significativa entre ambos tipos de muestras.

Por otro lado, los datos encontrados para los controles en la última semana de este ensayo, presentaron disminución considerable en la concentración del plaguicida, lo cual se debió posiblemente, a contaminación de las muestras con microorganismos e hidrólisis del plaguicida durante el proceso de adición de agua destilada.

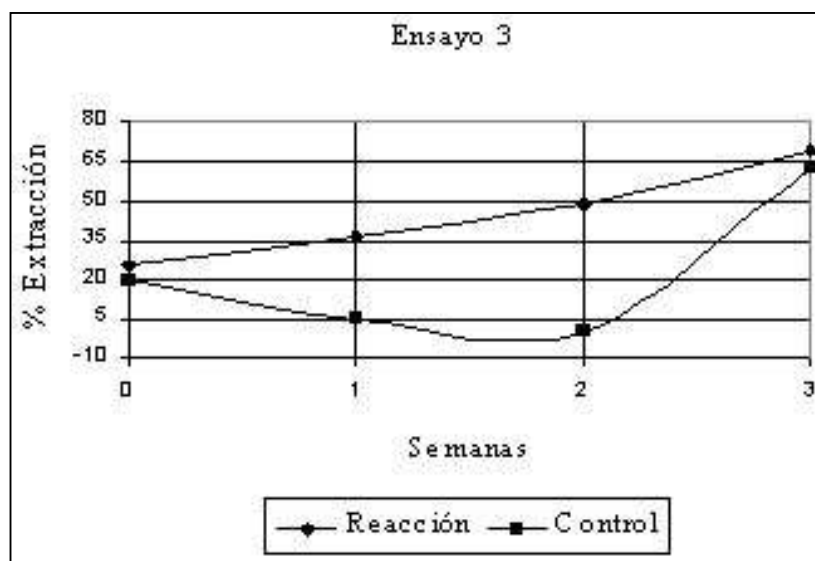


Figura 6 Promedios de degradación en el ensayo 3

Igualmente, la curva ascendente de la degradación de clorpirifos en las muestras con hongo, lleva a plantear que el diseño de ensayos con una duración superior a 21 días (35 días por ejemplo) podría lograr porcentajes de degradación cercanos al 100% y el mejoramiento de las condiciones químicas y biológicas del suelo afectado.

Asimismo, se tienen porcentajes de degradación de las muestras de 31,03% para la primera semana y 48,96% para la segunda, por encima de los controles. Esto indica que el hongo a esta concentración de clorpirifos favorece la degradación en porcentajes superiores a los generados por los agentes químicos naturales presentes en los controles.

Análisis conjunto de los tres ensayos

En este proyecto se obtuvieron, porcentajes de degradación en promedio de 96,31% para las muestras con hongo del ensayo uno, de 82,38% para el ensayo dos y de 69,17% para el tres. Esto indica que a medida que disminuye la concentración en los ensayos, aumenta el porcentaje de degradación del plaguicida aproximadamente en un 13%.

Adicionalmente, se tiene, que las curvas de degradación de las muestras y los controles, presentan tendencia ascendente en los tres ensayos (acercándose 100% de degradación del clorpirifos), siendo más notoria esta tendencia en las curvas de las muestras con hongo. Esto fue evaluado mediante MANOVA, encontrando que no existe diferencia estadística entre las medias de las muestras obtenidas semanalmente, lo cual indica que las condiciones utilizadas en los ensayos como: concentración de plaguicida, cantidad de hongo adicionado, contenido de nutrientes, temperatura, tipo de suelo y el soporte aplicado, favorecieron el efecto del hongo sobre la degradación del plaguicida.

Por otro lado, los valores de degradación alcanzados en los ensayos 2 y 3 indican que es necesario generar investigaciones adicionales que permitan evaluar cómo el cambio en las condiciones de

crecimiento del hongo, adición de oxígeno a las muestras como lo sugiere Bumpus et al. [15] y cambio de soporte, entre otras, acelera el proceso de degradación.

Estudios efectuados por Mougin et al. [16], y Adam y Wainwright [17], encontraron que la mezcla del *P. chrysosporium* con otros microorganismos (para el caso de Mougin con microorganismos del suelo) favorece la degradación de los plaguicidas Benomil y Lindano. Esto indica que es importante en estudios posteriores, evaluar cómo la mezcla del hongo con otros microorganismos, puede generar sinergismos que aumenten la velocidad de degradación del clorpirifos y reduzcan el tiempo y los costos de los proyectos de biorremediación.

Analizando los mecanismos empleados por el hongo para degradar el clorpirifos en los tres ensayos, Bumpus et al. [15] afirman que la adición de *P. chrysosporium* ocasiona el rompimiento del anillo clorinado pirinidil del clorpirifos, sin embargo, no logran especificar si esta degradación es debida a la acción de las enzimas extracelulares secretadas por el hongo. Asimismo, Pointing [18] propone que la degradación de los organofosforados fenitrotion y fenitrooxon, con el hongo no ligninolítico *Trichoderma viridae*, concluye que la degradación del clorpirifos no es mediada por las enzimas extracelulares de *P. chrysosporium*.

En lo referente a otros plaguicidas, Kohler [19] mostró en sus investigaciones que las enzimas extracelulares de *P. chrysosporium* no degradan el DDT; Kennedy et al. [20] no comprobaron la forma de acción de dichas enzimas en la degradación del lindano y el clordano y Kullman y Matsumura [21] encontraron que el metabolismo del endosulfán no incluye la acción de las peroxidases extracelulares y por esto plantearon un modelo de degradación distinto al hidrolítico y al oxidativo.

Por el contrario, Valli et al. [22] hallaron que el plaguicida 2, 7-diclorodibenzo-p dioxin fue mineralizado por las enzimas ligninoperoxidasas

(Lip) y manganesoperoxidas (Mnp) a través de reacciones de oxidación, reducción y metilación, las cuales permitieron la remoción de los átomos de cloro y destrucción del anillo presente en el compuesto.

Racke et al. [13] haciendo referencia a las vías de degradación del clorpirifos en el suelo, muestra que existe una formación inicial del metabolito TPC por hidrólisis o fotólisis, una posterior degradación por los microorganismos, una mineralización y por último una incorporación del carbono obtenido a la materia orgánica del suelo.

Igualmente, Murray et al. [14] propone que las principales rutas de degradación del clorpirifos son mediadas por las reacciones de hidrólisis (las cuales dependen principalmente del *pH* del suelo, la temperatura y la humedad) y por la acción de los microorganismos. Explica además, que el principal producto de degradación de este plaguicida es el 3, 5, 6 tricloro-2-piridinol (TPC), el cual genera el 3, 5, 6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP) y por último dióxido de carbono.

Partiendo de lo encontrado por los autores anteriores, es posible concluir que no existe en la actualidad claridad acerca de cuáles tipos de enzimas o qué mecanismos están involucrados en el proceso de degradación del clorpirifos con *P chrysosporium*; por esto se propone una segunda fase de esta investigación, que responda a los interrogantes relacionados con este tema. Igualmente, es importante en la segunda fase de este proyecto medir los porcentajes de mineralización que se logran en los ensayos y estudiar los mecanismos que utiliza el hongo para la degradación, lo cual involucra la evaluación de la acción de las enzimas intracelulares y extracelulares y la identificación de los productos intermedios de degradación.

Conclusiones

El hongo *P. chrysosporium* puede crecer en agar Sabureau y agua, en concentraciones de clorpirifos que varían entre 0,1 y 480 mg/L.

En los resultados del análisis univariado, se encontró que existe diferencia significativa entre los datos obtenidos en los controles y las reacciones, lo cual evidencia el efecto que causa la adición del hongo, sobre la disminución en la concentración de clorpirifos presente en las muestras.

En los datos del análisis multivariado se probó estadísticamente, que existe diferencia significativa entre las medias de los porcentajes de extracción de los tratamientos en los tres ensayos, lo cual muestra que el cambio en la concentración inicial de clorpirifos en cada ensayo afecta la diferencia en el porcentaje de extracción entre los controles y las reacciones, encontrando mayor degradación del plaguicida en el ensayo 1.

Durante los 21 días de investigación se lograron altos porcentajes de degradación para los tres ensayos, teniendo en promedio, valores de 96,31% para el ensayo uno, de 82,38% para el dos y 69,17% para el tres.

Existió una tendencia ascendente en las curvas de degradación de las muestras con hongo, acercándose claramente al 100% de degradación, lo cual muestra que las condiciones utilizadas en la investigación, fueron favorables para la degradación del plaguicida por parte del hongo.

Recomendaciones

Se sugiere desarrollar una segunda fase de investigación orientada a evaluar si el hongo *Phanerochaete chrysosporium* es capaz de desarrollar procesos de cometabolismo y sinergismos con los organismos presentes en el suelo y estudiar cuáles son los mecanismos que utiliza el hongo para la degradación, lo que involucra la acción de las enzimas intracelulares y extracelulares.

Igualmente, se deben evaluar los productos intermedios de degradación del clorpirifos, con el objeto de ver si estos compuestos son más móviles y más tóxicos que el clorpirifos y cómo su producción afecta el equilibrio de los ecosistemas del suelo.

Por último es necesario afirmar que la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas, es un área emergente en Colombia y su desarrollo depende, entre otras cosas, del establecimiento de estrategias para la caracterización de las áreas afectadas por la contaminación, la formación de personas capacitadas y el fortalecimiento de grupos de investigación en los temas de biorremediación.

Referencias

- Márquez, Sara. *Evaluación de algunos efectos de la contaminación por aplicación de lorsban (clorpirifos) en un suelo y un cultivo de kikuyo (Pennisetum clandestinum hochst ex chiov) en el norte antioqueño*. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. Medellín. 2001. 143 p.
- Racke, K. "Environmental fate of chlorpyrifos". En: *Rev. Environmental Contamination Toxicology*. N.º 131. 1993. pp. 1-154.
- González, Jaime. *Entrevista personal*. Laboratorio CIA. Universidad de Antioquia. Medellín. 2003.
- Díaz, Abel. *Diseño estadístico de experimentos*. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. 1999. p. 337.
- Montgomery, D. *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamericana. México. 1991. p. 589.
- Montgomery, D. et al. *Introduction to lineal regresion analisis*. Segunda edición John Wiley and Sons. USA. 1992. pp. 56-57.
- Johnson, R. y D. Wichern, *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice Hall. New York. 1992. p. 642.
- Mardia, KV et al. *Multivariate analysis*. Academic Press, Duluth. London. 1979.
- Neter, J. et al. *Applied linear statistical models*. Irwin. Boston, USA. 1990.
- Lopera, Margarita María. *Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo Phanerochaete chrysosporium*. Tesis para optar a título de magíster en Ingeniería Ambiental. Universidad de Antioquia. Medellín. 2004. p. 127
- Dasappa, S. y R. Oler. R. "Toxicity reduction in contaminated soil bioremediation processes". En: *Water Research*. Vol. 25. N.º 9. 1991. pp. 1121-1130.
- Liu, R. et al. "Hydrolysis of chlorpyrifos in natural waters of the Chesapeake Bay". En: *Chemosphere*. Vol. 44. 2001. pp. 1315-1323.
- Racke, K. et al. "Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil". En: *Journal Agricultural Food Chemistry*. Vol. 44. 1996. pp. 1582-1592.
- Murray, R. et al. "Stability of chlorpyrifos for termiticidal control in six Australian soils". En: *Journal Food Chemistry*. Vol. 49. 2001. pp. 2844-2847.
- Bumpus et al. "Fungal degradation of organophosphorous insecticides". En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 39. N.º 40. 1993. pp. 715-725.
- Mougin, C. et al. "Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". En: *Soil Biology Biochemistry*. Vol. 29. N.º 9-10. 1997. pp. 1321-1324.
- Adam, T. y M. Wainwright. "Growth of *P. chrysosporium* in soil and its ability to degrade the fungicide benomyl". En: *Bioresource Technology*. N.º 49. 1994. pp. 197-2001.
- Pointing, S. "Feasibility of remediation by white - rot fungi". En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001. 25 p.
- Kohler, A. et al. "Extracellular ligninase of *P. chrysosporium* bursdall has no role in degradation of DDT". En: *Applied Microbiology Biotechnology*. Vol. 29. 1988. pp. 618-620.
- Kennedy, D. et al. "Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus, *P. chrysosporium* (bkmf-1767)". En: *Applied and Environmental Microbiology*. Agosto. 1990. pp. 2347-2353.
- Kullman, S. y F. Matsumura. En: "Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan". En: *Applied and Environmental Microbiology*. Febrero. 1996. pp. 593-600.
- Valli, K. et al. "Degradation of the 2, 7- dichlorodibenzo-p dioxin by the lignin degrade basidiomycete *p. chrysosporiu*". En: *Journal Bacteriology*. Vol. 174. 1992. pp. 2131-2137.