

Evaluación de la Micorremediación del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) en la eliminación de residuos farmacéuticos: paracetamol, ibuprofeno y ciprofloxacino.

D. Lara-Luque¹, M. Flores-Ortiz¹, E. León-Rodríguez¹
¹IES Fidiana de Córdoba.

INTRODUCCIÓN:

Hoy en día, los medicamentos son uno de los contaminantes emergentes del medio ambiente, por lo que debe de ser una de las líneas prioritarias de investigación para los organismos de protección de la salud y del medioambiente. Se ha detectado residuos en aguas superficiales y profundas principalmente, pero también en biota, suelo y aire. Por ello, es necesario determinar las consecuencias que la acumulación de los principios activos correspondientes podría tener para la salud humana; pero también investigar sobre procesos biológicos para reducir la farmacontaminación. En esta investigación estudiamos la eliminación de estos residuos de manera fácil, rápida y económica mediante micorremediación con el Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*).

OBJETIVO:

El principal objetivo de este proyecto es valorar la capacidad de degradación del Hongo Ostra (*Pleurotus ostreatus*) de diversas tipologías farmacológicas, como el paracetamol (analgésico y antipirético), ibuprofeno (antiinflamatorio) y ciprofloxacino (antibiótico).



METODOLOGÍA:

La investigación se ha llevado a cabo en el IES Fidiana durante todo el curso escolar. Podemos dividir el proyecto en 5 etapas:

1-PLANTEAMIENTO: Durante las primeras semanas de curso llevamos a cabo el diseño del proyecto y una planificación inicial, teniendo claro que queríamos algo actual y asequible en el laboratorio del centro.

2-EXPERIMENTACIÓN INICIAL: Fue un tiempo extenso hasta que tuvimos el espectrofotómetro, realizamos las diferentes rectas de calibrado con las que íbamos a comprobar la capacidad degradadora del hongo en fármacos. Para ello, nos adentramos en el mundo de la química para preparar reactivos que nos permitieran evaluar por ensayos colorimétricos diferentes concentraciones de los medicamentos. Midiendo la absorbancia a determinadas longitudes de onda, según el medicamento, y a pesar de muchos inconvenientes técnicos con el espectrofotómetro, logramos elaborar las rectas con un excelente grado de fiabilidad (valores de R² de 0,96 a 0,99)

3-PREPARACIÓN DEL CULTIVO (PDA) PARA EL ENSAYO EN ESTUFA: se elaboró un medio líquido a partir de la cocción de 250g de patata y 15g de dextrosa por litro, ello permitió el crecimiento del hongo en los matraces Erlenmeyers (3 con soluciones con concentraciones iniciales del antibiótico, antipirético y antiinflamatorio y 1 control de cada medicamento). Sin embargo, se contaminaron por el déficit de esterilidad ambiental a la hora de tomar datos y tuvimos que abandonar este ensayo.

4-MONTAJE DEL ENSAYO EN MAGENTAS: a partir de 10g de micelio del hongo y materia orgánica, se vertieron 10 ml de las soluciones iniciales en cada magenta (3 repeticiones biológicas de cada medicamento y 3 controles). El ensayo duró 7 días, y se tomaron muestras el día cero, a los 3 y 7 días. A dichas muestras se le determinó la concentración de cada medicamento existente en el medio. La última medida se realizó triturando el micelio con sus cuerpos fructíferos con 50 ml de agua, se filtró el contenido y se separó en dos tubos para su posterior centrifugación. Una vez separados los restos sólidos del líquido, se tomaron dos alícuotas de 1,5 ml de cada pareja de tubos (una por tubo). Una vez obtenidas todas las alícuotas, se procedió a la medición de cada una. Esta última medida nos permitió asegurarnos de la completa extracción de posibles restos de medicamentos. Además, en este ensayo se determinó peso del micelio final y número de basidios desarrollados por tratamiento.

5-ENSAYO EN ESTERILIDAD: el hongo, el cultivo (PDA) y las soluciones de medicamento fueron esterilizados en el CSIC en autoclave. Se dispusieron en placas de Petri 4 repeticiones por ensayo y el micelio se sometió a esterilización previa, la mitad 10 minutos en lejía al 20%, y la otra mitad en etanol 70%. Se tomaron 2 alícuotas, una en el primer día y otra al tercero, estas se centrifugaron 2 veces, una primera 7 min a 4000rpm y una segunda 3 min a 6000rpm. A partir de estas muestras se determinaron las concentraciones de los medicamentos.



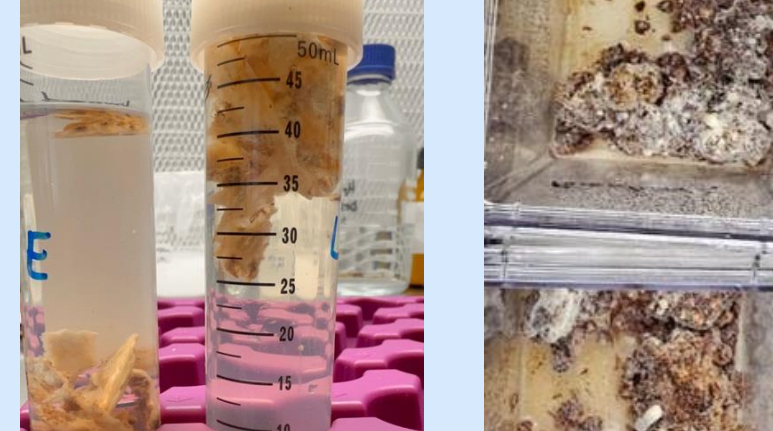
Preparación medio PDA



Ensayo en estufa con problemas de contaminación



Basidio

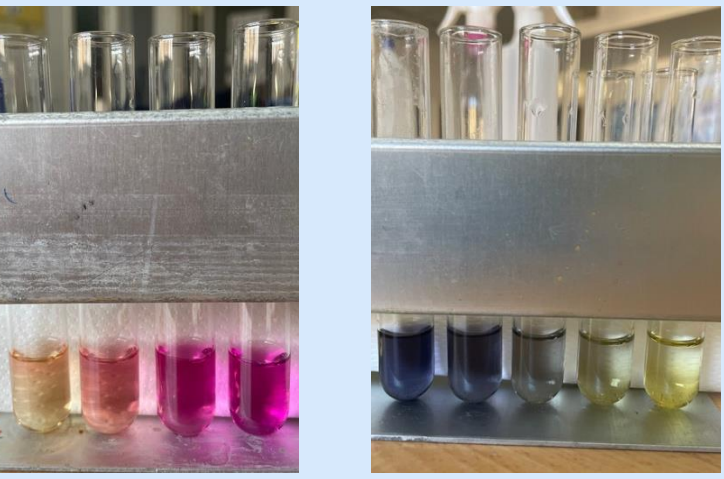


Esterilización del micelio con lejía y etanol

Micelio



Espectrofotómetro (Spectronic 20D)



Ensayo ciprofloxacino

Ensayo paracetamol



HCL



KMnO₄



H₂SO₄



FeCl₃

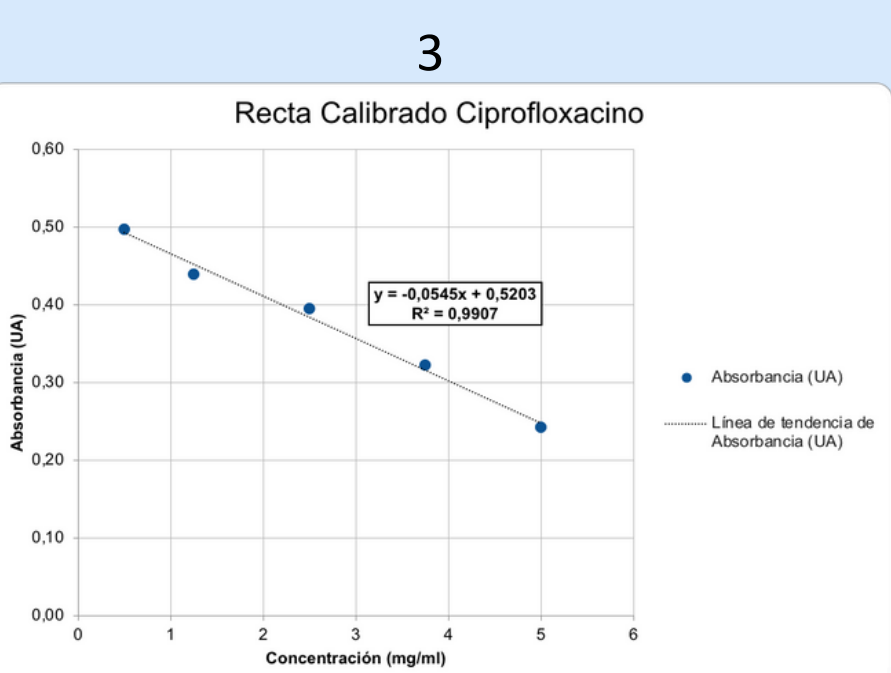
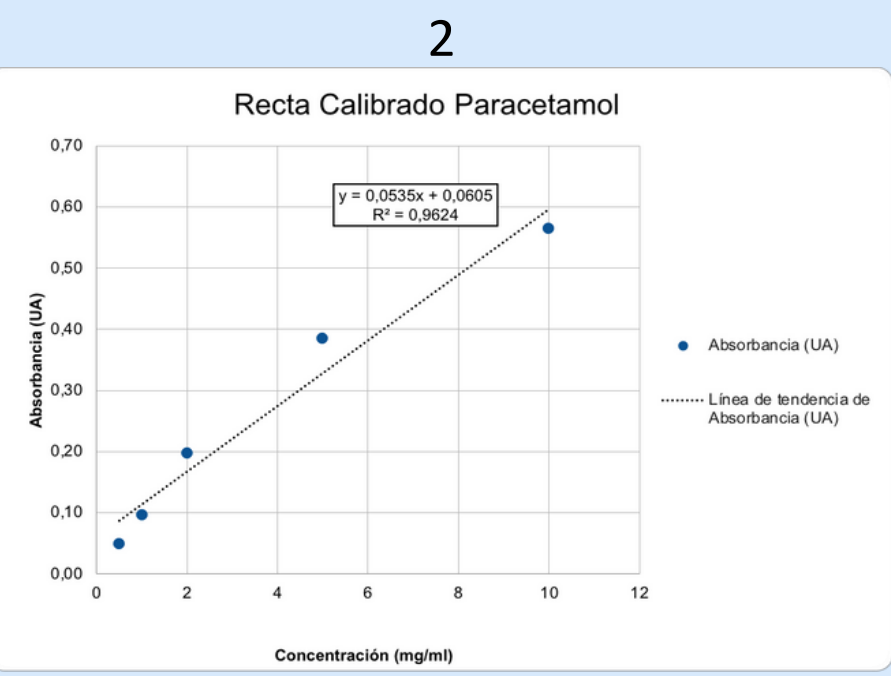
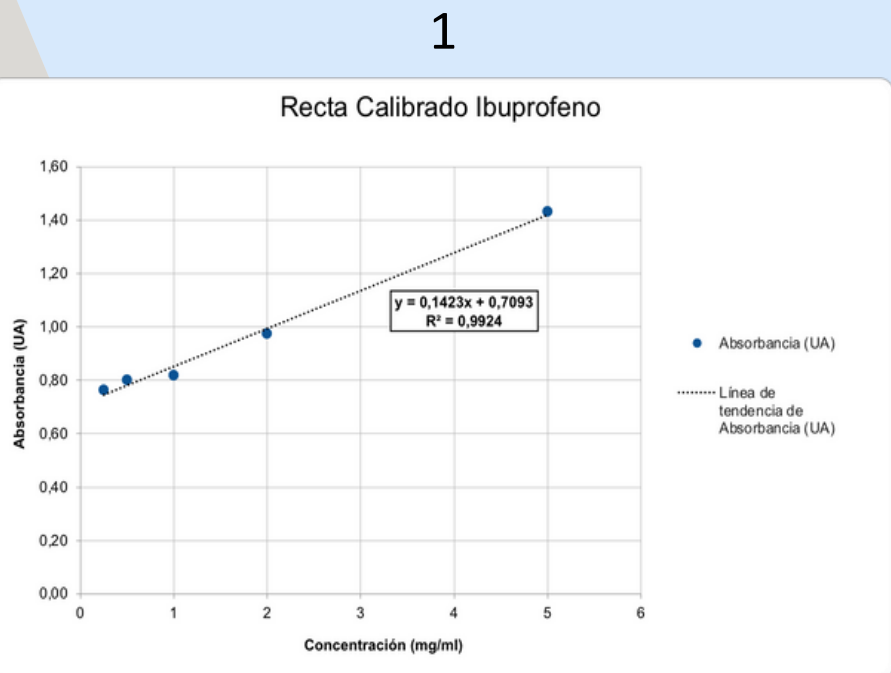


Ensayo en esterilidad

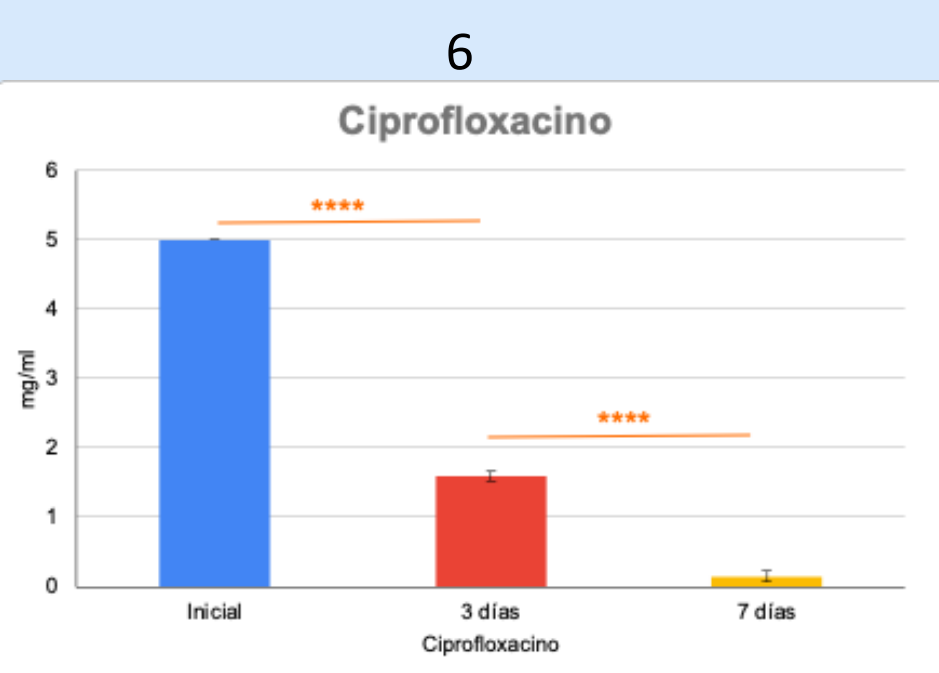
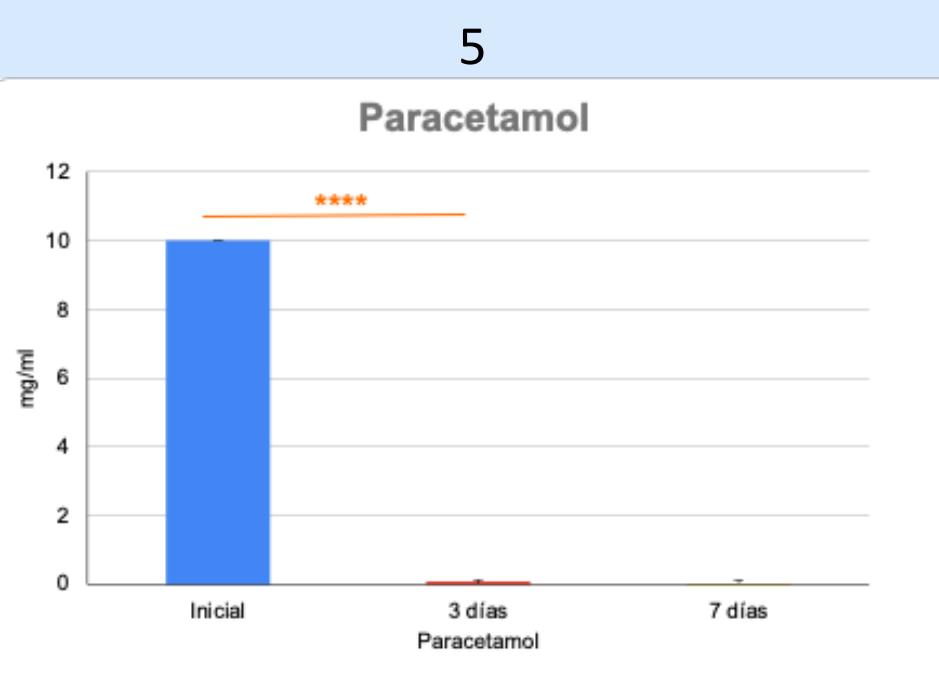
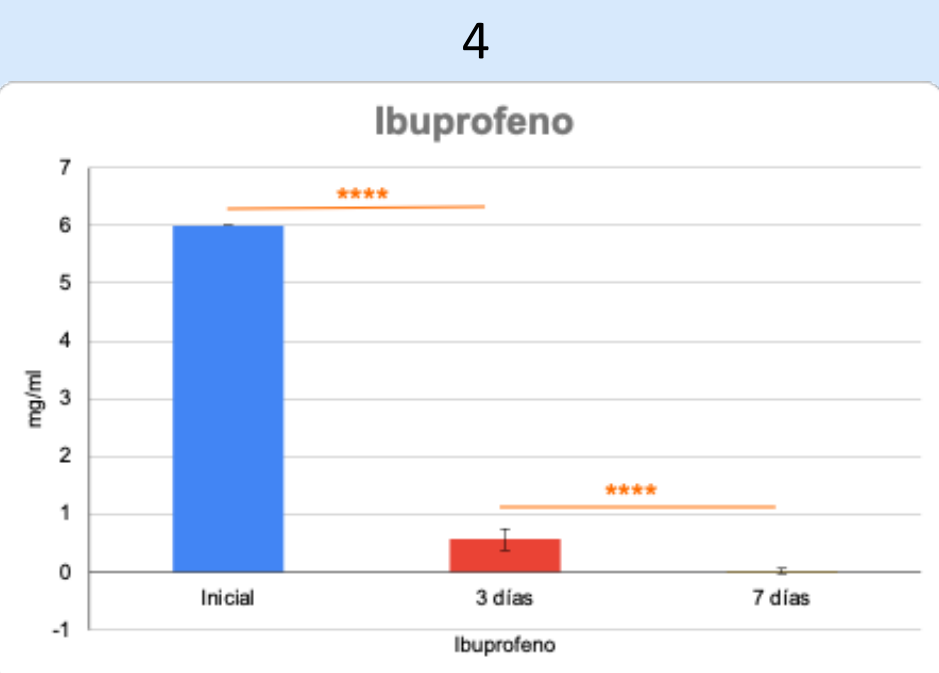
ENSAYO EN MAGENTAS

RESULTADOS:

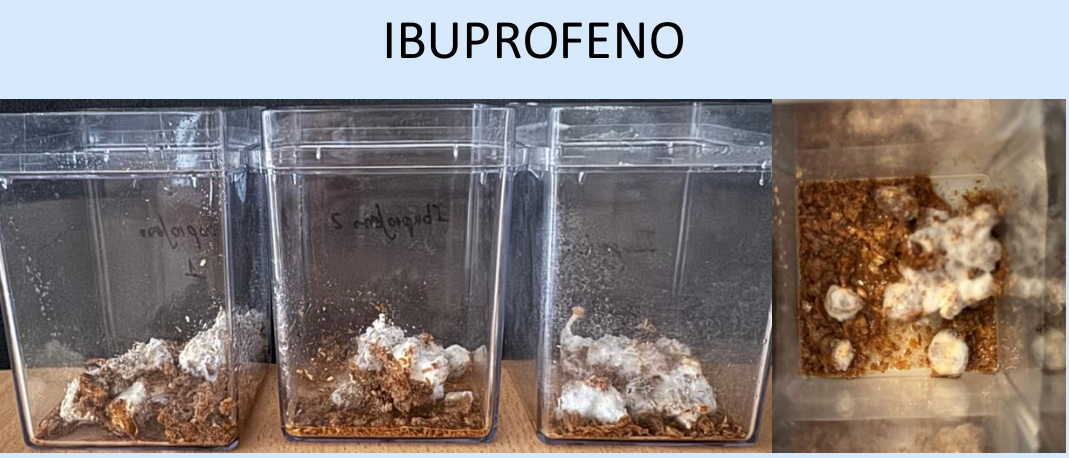
ENSAYO EN ESTERILIDAD



Gráficas 1, 2 y 3: Rectas de calibrado. Se representa absorbancia (ua) frente a la concentración (mg/ml) del Ibuprofeno, Paracetamol y Ciprofloxacino, respectivamente.



Gráficas 4, 5 y 6: Degradación de los medicamentos. Muestran la concentración del medicamento encontrada a los 3 y 7 días.



PARACETAMOL



CIPROFLOXACINO



CONTROL

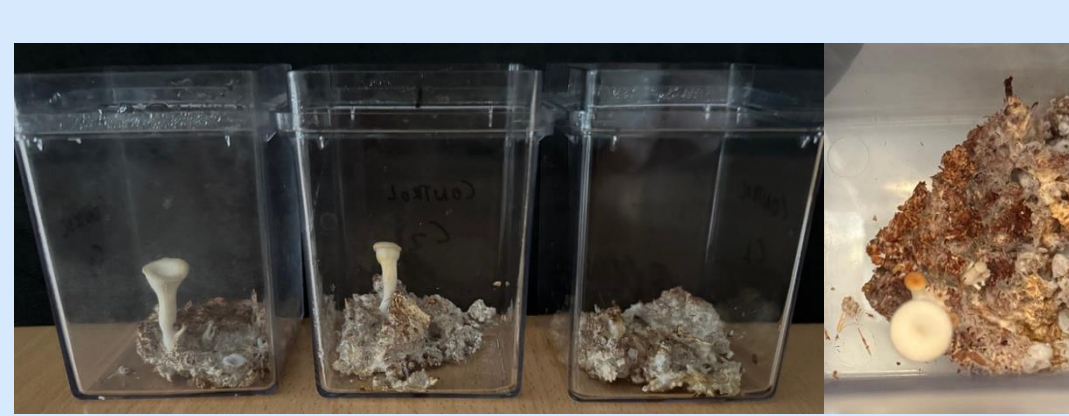
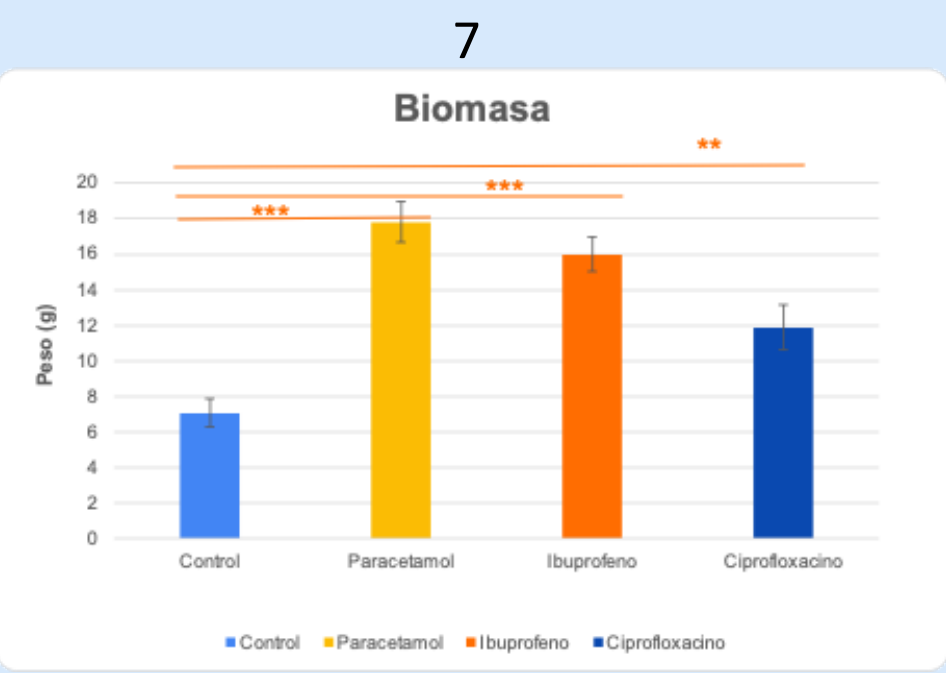
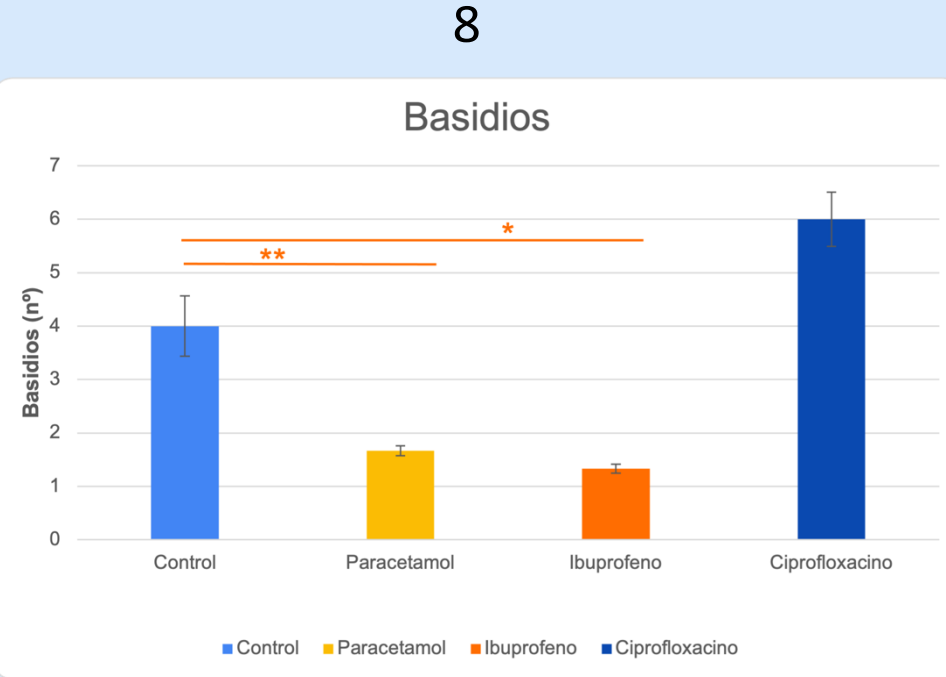


Figura 1: Desarrollo del micelio y basidios en magentas



Gráfica 7: Muestra la cantidad de biomasa del hongo a los 3 días y 7 días.



Gráfica 8: Muestra la cantidad de Basidios (cuerpo fructífero) a los 3 días y 7 días.

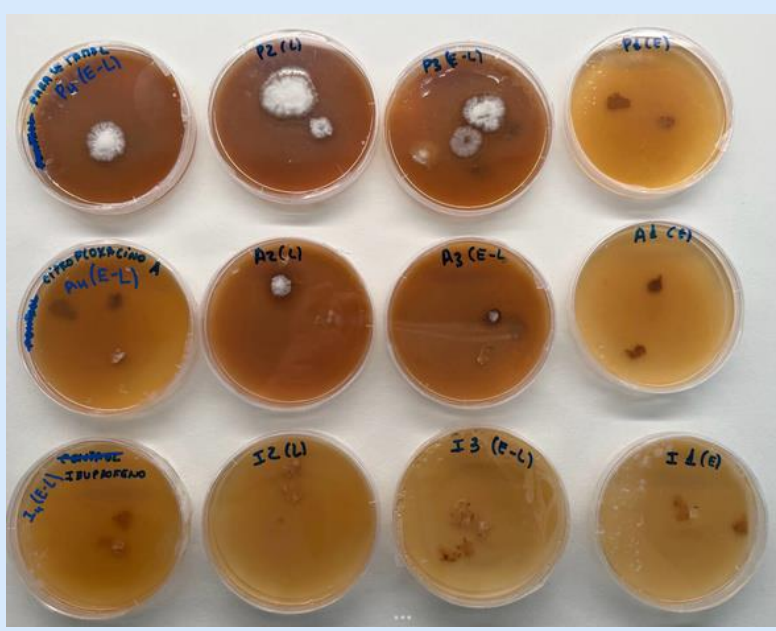


Figura 2: Desarrollo del micelio en placas de Petri por tratamiento.

A

Micelio crecido			
	Lejía/Etanol	Lejía	Lejía/Etanol
Paracetamol	Si	Si	No
Ciprofloxacino	Si	Si	No
Ibuprofeno	No	No	No

B

Diámetro de micelio crecido (cm)			
	Lejía/Etanol	Lejía	Lejía/Etanol
Paracetamol	2,25	3,26	4,05
Ciprofloxacino	0,45	1,25	0,675
Ibuprofeno	-	-	-

Tablas A y B: Muestran el estudio crecimiento del micelio. Presencia o ausencia (A) y diámetro del micelio (B), respecto a los medios tratados con los diferentes medicamentos y la esterilización del micelio con etanol o lejía.

C

Concentración medicamento (mg/ml)				
	Lejía/Etanol	Lejía	Lejía/Etanol	Etanol
Paracetamol	Inicial	1,94	1,94	-
	1 día	1,59	1,09	-
	3 días	1,33	1,05	-
Ciprofloxacino	-	-	-	-
Ibuprofeno	-	-	-	-

Tabla C: Muestra la concentración de medicamento al cabo del tiempo en el medio con paracetamol, único medio en el que se desarrolló el hongo a los tres días.

CONCLUSIONES:

- Hay una disociación entre crecimiento vegetativo del hongo y reproducción, una mayor biomasa, no implica mayor número de basidios
- Paracetamol e Ibuprofeno, inhiben la reproducción (basidios) pero promueven el crecimiento vegetativo del hongo (micelio). Por el contrario, ciprofloxacino estimula tanto la formación de micelio como la de basidios, pero especialmente lo hace en la formación de estructuras reproductoras. Todos los medicamentos incrementan la masa fúngica, destacando el paracetamol.
- El hongo mostró una alta eficiencia para metabolizar los tres medicamentos. El paracetamol fue degradado en su totalidad (99,7%), el ibuprofeno también demostró alta degradación, aunque algo más lenta al principio (90%). Ciprofloxacino, al tercer día, aún persistía el 32 %, pero a los 7 días la degradación fue del 97,2%
- El tratamiento de esterilización con etanol inhibe le crecimiento del micelio: pero la lejía no parece afectar a la viabilidad el micelio.
- En condiciones de esterilidad, solo se evaluó la capacidad degradadora del paracetamol, condiciones donde creció el micelio, observando que, a mayor diámetro del micelio, mayor degradación del compuesto (un 45% máximo).

CONCLUSIÓN FINAL:

En conclusión, podemos observar que el hongo *Pleurotus ostreatus* es capaz de degradar los medicamentos y utilizarlos para sobrevivir. *Pleurotus ostreatus* podría ser utilizado en tratamiento de aguas residuales farmacéuticas y descontaminación de suelos con vertidos hospitalarios, mediante inoculación del hongo, así como utilizarse en plantas de tratamiento de aguas residuales (micofiltros). Es un agente fúngico degradador de paracetamol, ibuprofeno y ciprofloxacino, metabolizándolos en entornos adversos y, por tanto, un organismo fúngico con potencial para biorremediación en farmacontaminación.

AGRADECIMIENTOS:

- A la profesora del IES Fidiana que coordina el proyecto de investigación, Elena León Rodríguez, por ayudarnos a entender el funcionamiento del proyecto y su realización, así como a dirigir los documentos de investigación.
- Al IES Fidiana, por apoyar proyectos relacionados con las actividades investigación.
- Al proyecto Fidiencia 3.0, por darnos la oportunidad de participar en un proyecto científico.
- Al IAS CSIC, en concreto al Departamento de Mejora Vegetal por proporcionarnos un ambiente óptimo para un ensayo en completa esterilidad.
- A Rocío Martínez Ruiz por su colaboración y ayuda en la resolución de los problemas técnicos del espectrofotómetro y búsqueda del micelio del hongo.