



Biodegradación y detoxificación de compuestos orgánicos persistentes

Gemini, V. ⁽ⁱⁱ⁾, Planes, E. ⁽ⁱ⁾, Gallego, A. ⁽ⁱⁱ⁾, Gomez, C. E. ⁽ⁱⁱⁱ⁾, Korol, S. ⁽ⁱⁱ⁾

(i) INTI-Química

(ii) Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires (UBA)

(iii) Instituto Nacional del Agua (INA)

Introducción

Los compuestos orgánicos persistentes son liberados al medio ambiente a través del vertido de efluentes industriales sin tratar o escasamente tratados o como el resultado del metabolismo de pesticidas y medicamentos. Los cresoles, clorofenoles y nitrofenoles constituyen ejemplos de este tipo de compuestos cuya concentración en el ambiente debe minimizarse a fin de evitar daños para la salud humana y en los ecosistemas. Los cresoles son empleados en la industria en grandes volúmenes y la magnitud de su vertido al medio ambiente hace que estos compuestos persistan en concentraciones suficientes para ejercer sus efectos tóxicos. Los clorofenoles son empleados en la industria y se forman en los procesos de desinfección por la acción del cloro sobre estructuras fenólicas. Los compuestos nitroaromáticos llegan al medio ambiente principalmente a través de fuentes antropogénicas ^[1]. Específicamente los nitrofenoles son empleados como intermediarios en la síntesis de colorantes, fármacos, pesticidas y explosivos. Además son liberados por hidrólisis de pesticidas como el paratión o malatión, que contienen la estructura nitrofenólica en su molécula. Al igual que los clorofenoles son compuestos xenobióticos caracterizados por una alta persistencia y toxicidad.

Entre las distintas alternativas disponibles para el tratamiento de compuestos orgánicos persistentes se destaca la biodegradación mediante el empleo de microorganismos específicamente seleccionados. Una ventaja importante de los procesos de remediación basados en la biodegradación frente a los procesos de destrucción química de los contaminantes es que la biodegradación no afecta a la flora y fauna del lugar, disminuyendo el impacto ambiental ^[2]. La versatilidad de las bacterias permite que puedan ser seleccionadas poblaciones autóctonas con capacidad para biodegradar una gran diversidad de compuestos en respuesta a las exigentes condiciones de presión selectiva de los ambientes contaminados ^[3].

Diversos autores ^{[1], [2], [4]} han descrito microorganismos capaces de degradar clorofenoles

y nitrofenoles, sin embargo no han contemplado la evaluación toxicológica del proceso aplicado. La biorremediación es efectiva cuando la remoción de los contaminantes conduce a una detoxificación. La actividad microbiana puede llevar a la formación de compuestos que a veces resultan más tóxicos que los compuestos originales. Nuestro grupo de trabajo ha seleccionado cepas y comunidades bacterianas autóctonas capaces de degradar altas concentraciones de compuestos orgánicos en tiempos compatibles con tratamientos biológicos de efluentes. El objetivo de esta investigación fue estudiar procesos de biodegradación y detoxificación de cresoles, clorofenoles y nitrofenoles.

Metodología / Descripción Experimental

Los compuestos químicos empleados en los ensayos de biodegradación fueron de grado analítico provistos por Mallinckodt Chemical Co. (St. Louis, USA) o Merck (Darmstadt, Germany).

Los microorganismos fueron seleccionados a partir de muestras de aguas superficiales tomadas de ambientes contaminados por la técnica de enriquecimiento. Para ello se realizaron cultivos sucesivos en frascos Erlenmeyer incubados en baño termostático con agitación. A partir de estos cultivos se seleccionaron cepas y comunidades bacterianas con capacidad degradativa de los compuestos en estudio, las que posteriormente fueron identificadas empleando pruebas tintoriales, bioquímicas convencionales y el sistema API 20 NE (Bio Merieux, l'Étoile, France).

Los microorganismos de ensayo fueron adaptados inoculando el medio mínimo suplementado con 50 mg/L del compuesto correspondiente e incubados en un baño termostático con agitación (200 rpm), a 28 °C durante 24 ó 48 horas, dependiendo del ensayo, conformando el cultivo stock.

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo en microfermentadores New Brunswick Multigen TA, operados en forma aeróbica a 28 °C con un volumen efectivo de 1.250 mL. Estos experimentos se realizaron en medio mínimo sintético con el agregado de distintas

concentraciones de los compuestos en estudio como única fuente de carbono y energía. En todas las experiencias el sistema fue inoculado con 5 mL del cultivo stock.

Para determinar la cantidad de compuesto remanente, las células bacterianas fueron separadas por centrifugación. La concentración del compuesto fue determinada por espectrofotometría UV-visible empleando un equipo Metrolab UV-visible 1700. Las longitudes de onda de trabajo fueron 290 nm, 292 nm, 305 nm, 310 nm y 400 nm para cresoles, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 4-nitrofenol, respectivamente. En el ensayo con 4-nitrofenol se adicionó una etapa de denitrificación con el objeto de eliminar el nitrito liberado durante la degradación aeróbica del compuesto. La denitrificación fue realizada en un reactor anóxico construido empleando un cilindro de vidrio sellado con el agregado de 100 mg/L de acetato de sodio

como fuente de carbono. El proceso se realizó a 28 °C durante 48 horas.

La evaluación de la toxicidad se realizó mediante el empleo de bioensayos de toxicidad con organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos. Se realizaron bioensayos con *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Vibrio fischeri* de acuerdo a las normas ISO 6341[5], ISO 8692[6] e ISO 11348-3[7], respectivamente. El ensayo de toxicidad con *Vibrio fischeri* se llevó a cabo empleando la cepa liofilizada NRRL B-11177 (Strategic Diagnostic Inc. Carlsbad, CA, USA) expuesta durante 15 minutos a la muestra. La luminiscencia fue medida utilizando el equipo Microtox® Modelo 500 (Azur Environmental, Carlsbad, CA, USA).

Tabla I. Cepas y comunidades bacterianas degradadoras seleccionadas. Concentraciones de compuesto ensayadas y eficiencia de remoción.

Microorganismo	Compuesto ensayado	Concentración inicial (mg/L)	Concentración final (mg/L)	Tiempo de incubación (h)	Eficiencia (% reducción compuesto)
<i>Pseudomonas putida</i>	Cresoles	540,0	0,5	31	99,9
<i>Alcaligenes sp.</i>	2-clorofenol	100,0	2,5	36	97,5
<i>Comamonas acidovorans</i>	2,4-diclorofenol	49,7	6,8	48	86,3
Comunidad bacteriana	2,4,6-triclorofenol	107,3	1,0	27	99,1
<i>Rhodococcus sp.</i>	4-nitrofenol	100,0	0,2	56	99,8

Los resultados de los ensayos realizados con *Daphnia magna* se expresaron como concentración efectiva 50 (CE50 48 h) definida como la concentración de la muestra que provoca la inmovilización de un 50% de la población ensayada luego de un tiempo de exposición de 48 horas.

Los resultados de los ensayos efectuados con *Pseudokirchneriella subcapitata* se expresaron como CE₅₀ 72 h, concentración que causa un 50% de reducción en el crecimiento del alga relativo a un control luego de un período de exposición de 72 horas. En los ensayos realizados con *Vibrio fischeri* los resultados se expresaron como CE₅₀ 15 min, definida como la concentración que provoca un 50% de reducción en la emisión de luminiscencia relativa a un control luego de un período de exposición de 15 minutos.

Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo en muestras tomadas al inicio y al final del ensayo de biodegradación y, en el caso de 4-nitrofenol, también se realizaron luego del proceso anóxico de desnitrificación.

Resultados

Las cepas y comunidades bacterianas seleccionadas fueron capaces de degradar altas concentraciones de los compuestos en estudio en tiempos compatibles con los de un proceso biológico de tratamiento de efluentes. Las eficiencias de remoción alcanzadas fueron en todos los casos superiores al 85% en términos de reducción del compuesto. En la Tabla I se resumen los resultados obtenidos para los distintos ensayos.

Los resultados obtenidos en los bioensayos de toxicidad realizados al inicio y al final de los procesos *batch* se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Bioensayos de toxicidad.

Bioensayo de toxicidad		Microorganismo / Compuesto ensayado				
		<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Comamonas acidovorans</i>	Comunidad bacteriana	<i>Rhodococcus sp.</i>
		cresoles	2-clorofenol	2,4-diclorofenol	2,4,6-triclorofenol	4-nitrofenol
<i>Vibrio fischeri</i> CE50 (%v/v)	Inicial	0,6	28,8	10,3	14,4	6,5
	Final	>90	>90	>90	>90	>90*
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> CE50 (%v/v)	Inicial	4,6	14,5	10,0	2,0	16,0
	Final	>90	>90	40,0	>90	>90*
<i>Daphnia magna</i> CE50 (%v/v) * Ensayos realizados luego del proceso anóxico	Inicial	<0,1	22,5	8,9	4,9	1,4
	Final	>90	32,8	34,5	>90	>90*

Es importante destacar que en los ensayos realizados con *Rhodococcus sp.* las muestras tomadas al final de proceso *batch* resultaron tóxicas. Esto puede deberse a que durante la degradación aeróbica de 4-nitrofenol por *Rhodococcus sp.* se libera nitrito como producto del metabolismo bacteriano. El nitrito fue removido del medio acoplado un proceso anóxico de desnitrificación a continuación del proceso aerobio. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que luego de la combinación de ambos procesos no se detecta toxicidad (ver *Tabla II*).

Conclusiones

Debe tenerse en cuenta que los compuestos en ensayo son tóxicos y pueden resultar inhibidores para los microorganismos capaces de llevar a cabo su biodegradación [3]. Se ha propuesto que la inducción de genes catabólicos que se produce en presencia de estos compuestos debe entenderse no solamente como un modo de obtención de energía por parte de las bacterias sino también como un mecanismo de defensa. En ese sentido la detoxificación que lleva a cabo la bacteria constituiría un componente más de sus mecanismos de respuesta al estrés [8].

Las agencias de protección ambiental en diferentes países recomiendan la aplicación de bioensayos de toxicidad para evaluar y caracterizar los efluentes industriales.

Las cepas y comunidades bacterianas autóctonas seleccionadas podrían ser empleadas en la biorremediación de efluentes y sitios contaminados con los respectivos compuestos. El empleo de bioensayos de toxicidad sería en ese caso una herramienta indispensable en el seguimiento y la evaluación de los procesos remediativos.

Referencias

- [1] F. D. Marvin-Sikkema, J. A. M. de Bont. "Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 499-507, 1994.
- [2] K. N. Timmis, D. H., Pieper. "Bacteria designed for bioremediation", *Trends in Biotechnology.* 17, 201-204, 1999.
- [3] N. J. Palleroni. "Microbial versatility" En: Young, L. Y., Cerniglia, C. E. (Editores.), *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals.* Wiley-Liss, New York 3-25, 1995.
- [4] A. Uysal, A. Türkman. "Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor", *Process Biochem.* 40, 2745-2749, 2005.
- [5] ISO 6341. 1996. Water quality. Determination of the immobility of *Daphnia magna* Strauss (*Cladocera, Crustacea*).
- [6] ISO 8692. 2004. Water quality. Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- [7] ISO 11348-3. 1998. Water quality. Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Part 3. Methods using freeze dried bacteria
- [8] D. Benndorf, I. Davidson, W. Babel. "Regulation of catabolic enzymes during long-term exposure of *Delftia acidovorans* MC1 to chlorophenoxy herbicides". *Microbiology.* 150: 1005-1014. 2004

Para mayor información contactarse con:
Dra. Estela Planes – biotec@inti.gov.ar