

Empleo de procesos biológicos para detoxificar *p*-nitrofenol

Virginia L. GEMINI,¹ Alfredo GALLEGO,¹ Carlos E. GÓMEZ,² Estela I. PLANES³ y Sonia E. KOROL¹

¹ Cátedra de Higiene y Sanidad. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956, 4º piso (1113), Buenos Aires, Argentina. sekorol@ffyb.uba.ar

² Instituto Nacional del Agua. C.C. N° 7, (1802), Aeropuerto Internacional de Ezeiza, Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Av. General Paz 5445, C.C. 157, (1650) San Martín, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

A partir de sedimentos de un río contaminado de Buenos Aires se seleccionó una cepa bacteriana autóctona de *Rhodococcus wratislaviensis* capaz de utilizar *p*-nitrofenol (PNP) como única fuente de carbono, nitrógeno y energía. La cepa bacteriana seleccionada degrada 0,36 y 0,72 mM PNP en 34 y 56 horas, respectivamente y libera el grupo nitro del compuesto como nitrito. Dado que el nitrito liberado durante la degradación aeróbica de PNP es también un compuesto tóxico ambiental el mismo fue removido acoplado un proceso anóxico de desnitrificación. La detoxificación fue evaluada mediante la realización de ensayos empleando *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Vibrio fischeri* de acuerdo a las normas ISO 6341 (E) (1996); ISO 8692 (2004) e ISO 11348-3 (1998) respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que no se detectó toxicidad luego de la combinación de ambos procesos, biodegradación aeróbica y desnitrificación en un proceso anóxico.

Palabras clave: biodegradación, *p*-nitrofenol, procesos biológicos, detoxificación.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos nitroaromáticos son liberados al medio ambiente casi exclusivamente a través de fuentes antropogénicas (Marvin-Sikkema y de Bont, 1994). Estos compuestos son utilizados en la fabricación de fármacos, pigmentos, colorantes, plásticos, pesticidas, fungicidas, explosivos y solventes industriales (Spain, 1995); pueden encontrarse en suelos como resultado de la hidrólisis de varios insecticidas organofosforados tales como paration y metilparation. Específicamente los nitrofenoles se hallan presentes en efluentes industriales, suelos y aguas subterráneas (Spain, 1995). Dentro de los mononitrofenoles el *p*-nitrofenol (PNP) es considerado contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), la que recomienda una concentración de PNP en aguas naturales por debajo de 10 ng L⁻¹. La

liberación de este compuesto en el ambiente constituye un riesgo tanto para los ecosistemas como para la salud humana puesto que es tóxico y puede acumularse en la cadena alimentaria.

PNP es un contaminante importante de aguas superficiales en Argentina donde efluentes industriales, hospitalarios y municipales no tratados o escasamente tratados son vertidos a cursos de agua. En Argentina, la Ley Nacional de Residuos Peligrosos (24051/92) y su decreto reglamentario (Decreto 831/93) establecen 0,2 µg L⁻¹ de nitrofenoles como nivel guía para la protección de la vida acuática en agua dulce superficial.

Tanto la planificación e implementación de métodos de tratamiento de aguas residuales como la optimización de plantas de tratamiento ya existentes son de especial relevancia considerando la necesidad de reducir los niveles de contaminantes.

Si bien el grupo nitro del PNP aumenta la resistencia del anillo aromático a la biodegradación, diversos autores han descrito cepas bacterianas capaces de utilizar este compuesto como única fuente de carbono, entre ellas las pertenecientes a los géneros *Arthrobacter* (Chauhan *et al.*, 2000), *Bacillus* (Kadiyala *et al.*, 1998), *Pseudomonas* (Prakash *et al.*, 1996), *Burkholderia* (Bhushan *et al.*, 2000), *Rhodobacter* (Roldán *et al.*, 1998), obteniéndose nitrito como producto del metabolismo aerobio.

En investigaciones anteriores nuestro grupo de trabajo ha seleccionado una cepa bacteriana autóctona de *Rhodococcus wratislaviensis* capaz de degradar en condiciones aerobias 0,36 mM y 0,72 mM de PNP liberándose nitrito al medio.

Considerando que el nitrito es tóxico y su presencia en el ambiente constituye un riesgo para las poblaciones, el presente estudio tuvo por objetivos: aplicar procesos biológicos para eliminar el nitrito liberado durante la biodegradación de PNP y evaluar la detoxificación de PNP mediante el uso de bioensayos de toxicidad empleando organismos pertenecientes a distintos niveles tróficos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó PNP de grado cromatográfico provisto por Mallinckodt Chemical Co. (St. Louis, USA). Todos los otros reactivos químicos fueron de grado

analítico provistos por Mallinckrodt o Merck (Darmstadt, Germany).

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo en medio mínimo sintético (Korol *et al.*, 1989) sin el agregado de la fuente de nitrógeno. La cepa bacteriana fue adaptada inoculando el medio mínimo suplementado con 0,36 mM de PNP e incubado en un agitador plano-rotatorio (200 rpm), a 28 °C durante 36 horas, conformando el cultivo stock.

Los experimentos fueron realizados en microfermentador New Brunswick Multigen TA operado 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 0,36 y 0,72 mM de PNP como única fuente de carbono y nitrógeno. En todas las experiencias el sistema fue inoculado con 5 mL del cultivo stock (concentración final 10^5 células mL⁻¹).

Durante la incubación 10 mL de muestra fueron removidos del sistema a intervalos apropiados con el objeto de determinar la cantidad de PNP remanente, el nitrito liberado, y evaluar el crecimiento microbiano.

Con el objeto de eliminar el nitrito liberado durante la degradación aeróbica de PNP se acopló un reactor anóxico, el proceso se realizó a 28°C durante 48 horas. Las condiciones anóxicas fueron obtenidas por llenado y sellado de un recipiente cilíndrico de vidrio al que se le agregó 100 mg L⁻¹ de acetato de sodio como fuente de carbono.

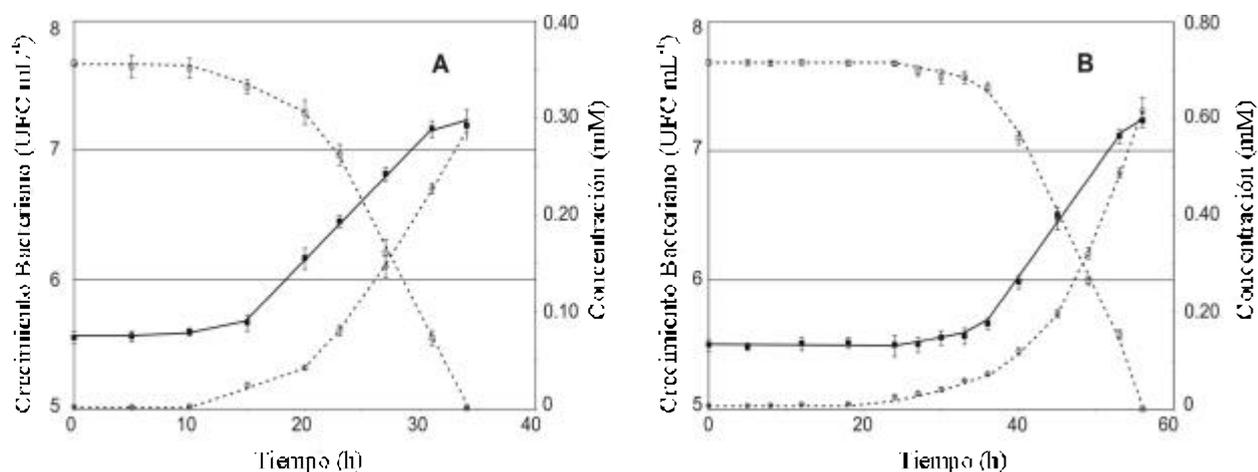


Figura 1. Degradación de PNP por *Rhodococcus wratislaviensis* en medio mínimo sintético con PNP como única fuente de carbono y nitrógeno. (A) Concentración inicial de PNP 0,36 mM (B) Concentración inicial de PNP 0,72 mM.

Cinética de crecimiento de *Rhodococcus wratislaviensis*: (---■---). Concentración de PNP: (---□---). Concentración de nitritos: (---○---).

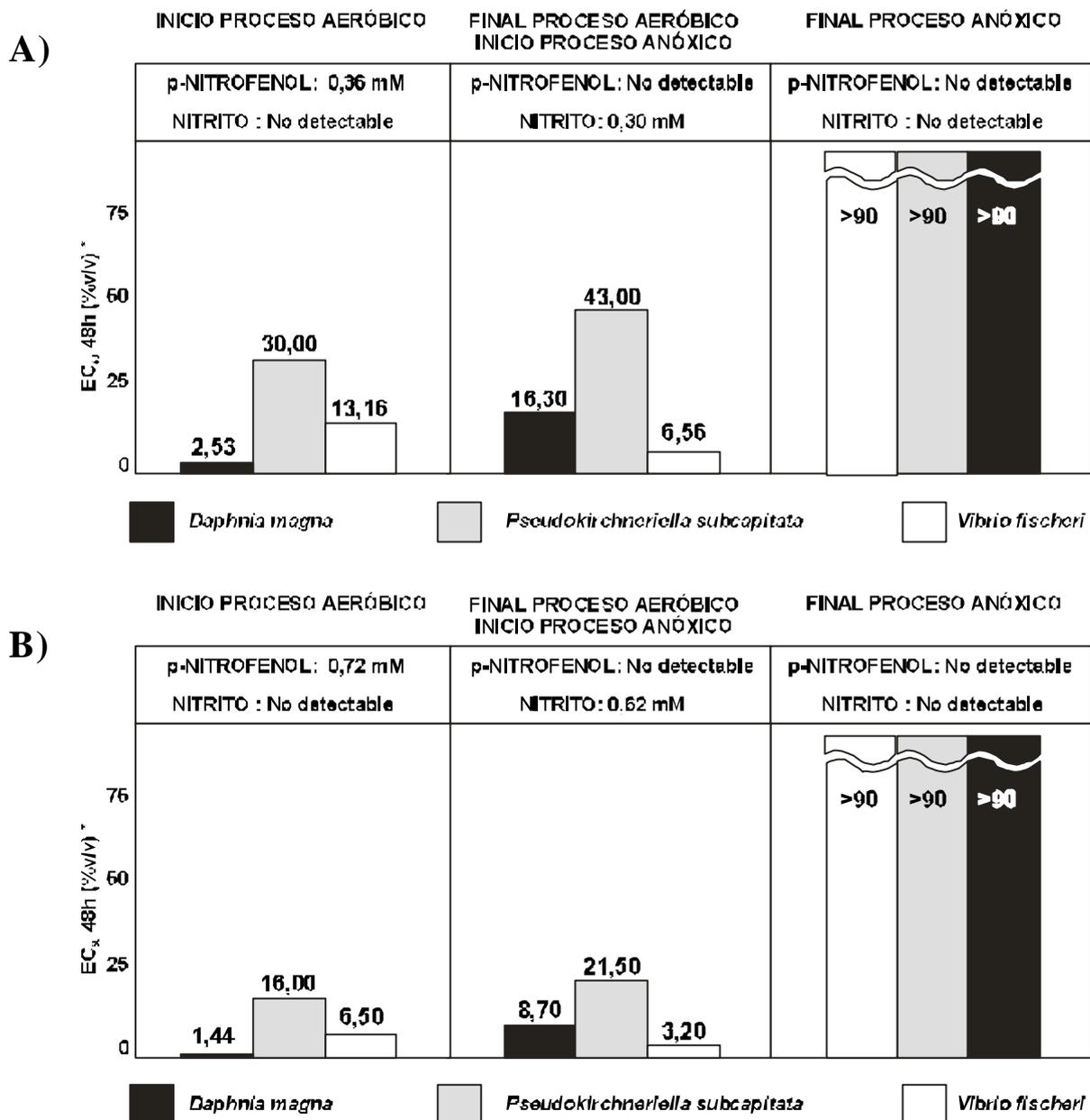


Figura 2. Evaluación de la detoxificación de PNP empleando: *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Vibrio fischeri* en las distintas etapas del tratamiento
 A: Concentración inicial 0,36 mM de PNP. B: Concentración inicial 0,72 mM de PNP.

Para determinar la cantidad de PNP remanente y el nitrito librado durante la biodegradación de PNP, las células bacterianas fueron separadas por centrifugación. La concentración de PNP fue determinada espectrofotométricamente a 400 nm. La concentración de nitrito fue determinada utilizando el método colorimétrico de acuerdo al Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). Todas las mediciones colorimétricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Metrolab UV 1700. Con el objeto de asegurar la completa biodegradación del

compuesto en estudio y la ausencia de metabolitos se realizó cromatografía gaseosa, empleando un equipo Hewlett-Packard 5890 Serie II con detector selectivo de masa. La determinación del crecimiento bacteriano se efectuó mediante la técnica de recuento en superficie en agar triptona soja (APHA, 1998).

Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo en muestras tomadas al inicio y al final del ensayo de biodegradación y luego del proceso anóxico de desnitrificación.

La detoxificación fue evaluada mediante la realización de ensayos empleando *Daphnia magna*,

Pseudokirchneriella subcapitata y *Vibrio fischeri* de acuerdo a las normas ISO 6341 (E) (1996); ISO 8692 (2004) e ISO 11348-3 (1998) respectivamente.

El ensayo de toxicidad con *Vibrio fischeri* se realizó 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).

Los resultados de los ensayos realizados con *Daphnia magna* se expresaron como concentración efectiva 50 (CE₅₀ 48-horas) definida como la concentración de la muestra responsable de 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 concentración efectiva 50 (CE₅₀ 72-horas) definida como la concentración que produce una reducción del 50% del crecimiento del alga relativo a un control. Para los ensayos realizados con *Vibrio fischeri* los resultados se expresaron como (CE₅₀ 15-minutos), definida como la concentración que provoca un 50 % de reducción en la emisión de luminiscencia relativa a un control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de biodegradación se llevaron a cabo con un inóculo inicial de 10⁵ células mL⁻¹. La Figura 1A muestra que la cepa creció exponencialmente con 0,36 mM de PNP como única fuente de carbono y nitrógeno con una velocidad de crecimiento específica (μ) de 0,18 h⁻¹ degradando 99,8% del sustrato en 34 horas. Al aumentar la concentración de PNP a 0,72 mM el proceso de biodegradación se llevó a cabo en 56 horas con una velocidad de crecimiento específica (μ) de 0,17 h⁻¹ (Figura 1B). Asimismo, la fase de latencia aumenta en forma proporcional con el incremento de la concentración del sustrato.

La biodegradación completa de PNP y la ausencia de metabolitos orgánicos se demostró mediante la realización de cromatografía gaseosa en muestras tomadas al final del proceso aeróbico (datos no mostrados).

Rhodococcus wratislaviensis libera nitrito al medio concomitantemente a la degradación de PNP. Esto sugiere una etapa inicial oxidativa en la biodegradación de PNP por este microorganismo (Chauhan *et al.*, 2000).

Es importante señalar que cuando los ensayos de biodegradación se realizaron en medio mínimo sintético con el agregado de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno la concentración de nitrito liberada fue estequiométrica a la concentración de PNP metabolizada (datos no mostrados).

Dado que el nitrito liberado durante la degradación aeróbica de PNP también es un

compuesto tóxico ambiental (Ray *et al.*, 1999) se estudio su eliminación añadiendo un proceso anóxico de denitrificación, luego de la aplicación de este proceso no se detectó nitrito en el medio.

El uso de la cepa de *Rhodococcus wratislaviensis* seleccionada fue entonces efectiva no solo para degradar PNP sino también para remover nitrito (Figura 2).

Los ensayos de toxicidad realizados con *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Vibrio fischeri* al inicio del proceso de biodegradación con 0,36 mM y 0,72 mM de PNP demostraron altos porcentajes de toxicidad. Las muestras tomadas al final del proceso aeróbico aún resultaron tóxicas debido a la presencia de nitrito en el medio, mientras que al final del proceso anóxico no se detectó toxicidad, hallándose valores de CE₅₀ superiores al 90% v/v (Figura 2).

La aplicación secuencial de procesos aeróbicos y anóxicos empleando la cepa seleccionada es una alternativa válida para la detoxificación de efluentes líquidos o ambientes contaminados con PNP.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del Proyecto B0125 subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires a través de la Programación Científica 2004-2007.

BIBLIOGRAFÍA

- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC.
- Bhushan, B., Chauhan, A., Samanta, S.K., *et al.* 2000. Kinetics of biodegradation of *p*-nitrophenol by different bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 274, 626-630.
- Chauhan, A., Chakraborti, A. K., Jain, R. K. 2000. Kinetics of biodegradation of *p*-nitrophenol by different bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 270, 733-740.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1980. Ambient water quality for nitrophenols. EPA-440/5 80-063, Washington, DC, USA.
- ISO 6341.1996. Water quality. Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).
- 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: Method using freeze-dried bacteria
- ISO 8692. 2004. Water quality. Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae.
- Kadiyala, V., Smets, B.F., Chandran, *et al.* 1998. High affinity *p*-nitrophenol oxidation by *Bacillus*

- sphaericus* JS905. FEMS. Microbiology Letter. 166, 115–120.
- Korol, S., Orsingher, M., Santini, P., *et al.* 1989. Biodegradation of phenolic compounds. II. Effects of inoculum, xenobiotic concentration and adaptation on *Acinetobacter* and *Pseudomonas* fenol degradation. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 31, 117–120.
- Marvin-Sikkema, F.D., de Bont, J.A.M. 1994. Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 42, 499–507.
- Prakash, D., Chauhan, A., Jain, R.K. 1996. Plasmid-encoded degradation of *p*-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 224, 375–381.
- Ray, P., Ait Oubelli, M., Loser, C. 1999. Aerobic 4-nitrophenol degradation by microorganisms fixed in a continuously working aerated solid-bed reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 51, 284-290
- Roldán, M.D., Blasco, R., Caballero, F.J., *et al.* 1998. Degradation of *p*-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Archives Microbiology.* 169, 36–42.
- Spain, J.C. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual Review of Microbiology.* 49, 523–555.