

Degradación microbiana de 2,4-dinitrofenol en efluentes líquidos: efecto de factores bióticos y abióticos

Virginia GEMINI, Evelin CORREA, Alfredo GALLEGO y Sonia KOROL

Cátedra de Higiene y Sanidad. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires
Junín 956, 4° piso, (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. E-mail: sekorol@ffybu.uba.ar

RESUMEN

Los compuestos nitrofenólicos son utilizados como intermediarios en la producción de fármacos, colorantes, pesticidas, conservantes de la madera y explosivos. El 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) es un compuesto tóxico y persistente considerado contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). En trabajos anteriores hemos seleccionado una cepa bacteriana autóctona identificada como *Rhodococcus opacus* capaz de utilizar 2,4-DNP como única fuente de carbono y nitrógeno.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la concentración del compuesto; el pH; la presencia de sustratos fácilmente biodegradables, de compuestos análogos estructurales tóxicos y de otros microorganismos en la degradación de 2,4-DNP por *Rhodococcus opacus*. Los ensayos de biodegradación se realizaron en efluentes líquidos sintéticos empleando microfermentadores de 2 litros de capacidad, a una temperatura de 28 °C, con agitación (200 rpm). La degradación de 2,4-DNP fue evaluada por espectrofotometría UV, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y el crecimiento bacteriano por recuento de microorganismos viables. *Rhodococcus opacus* fue capaz de degradar 0,27 mM y 0,54 mM de 2,4-DNP en 22 y 28 horas, respectivamente. La velocidad de degradación de 2,4-DNP disminuye con el aumento de la concentración del compuesto. *Rhodococcus opacus* demostró ser sensible a pH ácido, mientras que no hubo variaciones en la velocidad de degradación a pH 9. La presencia de compuestos fácilmente biodegradables y de análogos estructurales tóxicos no influye en el proceso degradativo. La aplicación de este estudio permitirá la planificación de estrategias para la biorrecuperación de efluentes líquidos y la biorremediación de aguas contaminadas.

Palabras clave: 2,4-dinitrofenol, influencia de factores, biodegradación.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos nitroaromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y han sido detectados en efluentes líquidos, ríos y suelos tratados con pesticidas. Son liberados al ambiente principalmente a través de actividades antropogénicas. Los nitrofenoles son utilizados como intermediarios en la producción de fármacos, colorantes, pesticidas, conservantes de la madera y explosivos (Spain, 1995; Zablutowicz et al., 1999; She et al., 2005). Estos compuestos son altamente tóxicos para el ser humano y mamíferos dado que son sustancias que pueden llevar a la formación de metahemoglo-

bina y son potentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Karim y Gupta, 2002). El 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) es un compuesto persistente en el ambiente considerado contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), que recomienda un nivel guía en aguas naturales menor de 10 ng/L (US EPA, 1980). En Argentina 2,4-DNP se encuentra en aguas residuales industriales, hospitalarias, agrícolas y cloacales que son vertidas a los cursos de agua sin tratamiento previo o escasamente tratadas provocando serios impactos ambientales.

Tanto en ecosistemas naturales contaminados como en efluentes líquidos 2,4-DNP puede encontrar-

se solo o asociado a otros contaminantes bióticos y abióticos. La temperatura, el pH y la presencia de otros compuestos pueden afectar la cinética de biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (Spain y Van Veld, 1983; Providenti et al., 1993). La presencia simultánea de sustratos fácilmente metabolizables puede producir en algunos casos un incremento en la eficiencia del proceso de biodegradación debido al aumento de la biomasa (Yang et al., 2005). En otros casos, la degradación del compuesto de interés puede verse inhibida por represión de enzimas catabólicas.

En investigaciones anteriores nuestro grupo de trabajo ha seleccionado una cepa bacteriana autóctona identificada como *Rhodococcus opacus* capaz de utilizar 2,4-DNP como única fuente de carbono y nitrógeno. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la concentración del compuesto; el pH; la presencia de sustratos fácilmente biodegradables, de compuestos análogos estructurales tóxicos y de otros microorganismos en la degradación de 2,4-DNP por *R. opacus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos

Para llevar a cabo el presente estudio se empleó una cepa bacteriana autóctona seleccionada a partir de muestras provenientes de sedimentos de un río altamente contaminado de Buenos Aires (Argentina), e identificada como *Rhodococcus opacus*.

Compuestos químicos

Se empleó 2,4-DNP de grado cromatográfico provisto por Riedel-de-Häen (Seelze, Germany). Todos los otros reactivos químicos fueron de grado analítico provistos por Mallinckrodt Chemical Co (St. Louis, USA), Sigma Chemical Company (St. Louis, USA) y Merck (Darmstadt, Germany). Las soluciones patrón de 2,4-DNP, fueron preparadas asepticamente disolviendo la cantidad necesaria en NaOH 0,1 N estéril.

Ensayos de biodegradación

Se realizaron cultivos de la cepa bacteriana en medio mínimo sintético (Korol et al., 1989), sin el agregado de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, suplementado con 0,27 mM de 2,4-DNP como única fuente de carbono y nitrógeno. Los cultivos fueron incubados en un baño termostático con agitación (200 rpm) a 28 °C durante 28 horas, 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 1250 mL. El estudio de la influencia de factores abióticos en la biodegradación

de 2,4-DNP se realizó en efluentes sintéticos conteniendo 0,54 mM del compuesto. Los factores estudiados fueron: concentración de 2,4-DNP, pH inicial, presencia de sustratos fácilmente biodegradables y presencia de compuestos análogos estructurales tóxicos. Con el objeto de evaluar la incidencia de otros microorganismos en la biodegradación de 2,4-DNP por *R. opacus* se realizaron ensayos en aguas superficiales adicionadas con 0,54 mM del compuesto. 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 de tiempo apropiados con el objeto de determinar la cantidad de 2,4-DNP remanente y evaluar el crecimiento microbiano.

Para determinar la concentración remanente de 2,4-DNP las células bacterianas fueron separadas por centrifugación y el sobrenadante fue analizado espectrofotométricamente a 360 nm utilizando un espectrofotómetro Metrolab UV 1700. El crecimiento bacteriano fue evaluado empleando la técnica de recuento en placa (APHA, 2005).

La evaluación de la biodegradación de 2,4-DNP se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando un cromatógrafo Waters 2695 equipado con detector de arreglo de diodos Waters 996. Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo utilizando una columna C18 Merck Lichrospher de 150 x 46 mm con una fase móvil isocrática de acetonitrilo:agua ÷ionizada (20:80) a un flujo de 1 mL por minuto. Con el fin de evaluar la presencia de metabolitos orgánicos al finalizar los

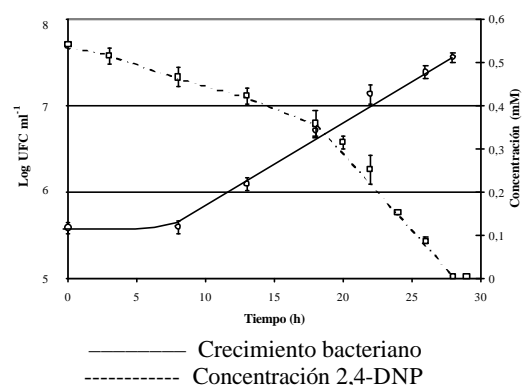


Figura 1. Degradación de 2,4-DNP (0,54 mM) por *R. opacus*.

ensayos de biodegradación se realizó cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (CG-MS) utilizando un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Parckard 5890 Series II equipado con un detector selectivo masa Model 5972 y una columna capilar (HP-5MS, 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm film),

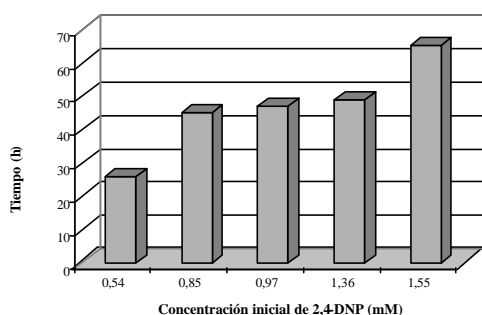


Figura 2. Influencia de la concentración inicial en la degradación de 2,4-DNP por *R. opacus*.

con un gradiente de temperatura de 50 °C-290 °C aumentando 20 °C por minuto.

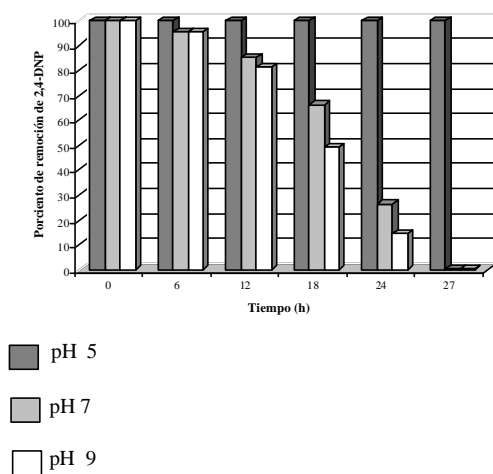


Figura 3. Influencia del pH en la degradación de 2,4-DNP (0,54 mM) por *R. opacus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La influencia de la concentración inicial en la biodegradación de 2,4-DNP por *R. opacus* fue evaluada en ensayos realizados en efluentes sintéticos conteniendo 0,54; 0,85; 0,97; 1,36 y 1,55 mM de 2,4-DNP como única fuente de carbono y nitrógeno. Las experiencias fueron llevadas a cabo en microfermentadores *batch* manteniendo constante la concentración de oxígeno disuelto, agitación, pH y temperatura durante el proceso. *R. opacus* creció exponencialmente en presencia de 0,54 mM de 2,4-DNP como única

fente de carbono y nitrógeno en el efluente sintético con una velocidad de crecimiento específica (μ) de $0,22 \text{ h}^{-1}$, degradando 99,5% del compuesto en 28 horas (Figura 1).

La Figura 2 muestra que al aumentar la concentración inicial del compuesto se incrementa el tiempo necesario para lograr la completa biodegradación de 2,4-DNP. Además, se observó una disminución en la velocidad de crecimiento específica (μ) con el aumento de la concentración del sustrato (datos no mostrados). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores y responden a la inhibición que producen altas concentraciones de compuestos tóxicos y persistentes (Kao y col, 1999).

Los efluentes líquidos, dependiendo de su origen, presentan condiciones variables de acidez y alcalinidad, por lo tanto es importante evaluar la influencia del pH en los procesos de depuración biológica. La velocidad de crecimiento específica de *R. opacus* no fue afectada a pH alcalino llevándose a cabo la degradación completa de 0,54 mM de 2,4-DNP en 28 horas. En cambio, el pH ácido afecta marcadamente el crecimiento bacteriano inhibiéndose la biodegradación del compuesto en estudio (Figura 3).

Teniendo en cuenta que los efluentes líquidos y sitios contaminados contienen una variedad de compuestos orgánicos sintéticos y/o naturales, individuales y mezclas de los mismos es importante evaluar tanto la influencia de compuestos no tóxicos fácilmente biodegradables como de compuestos análogos estructurales tóxicos en la biodegradación de 2,4-DNP. Glucosa y piruvato de sodio fueron elegidos como compuestos no tóxicos dado que su estructura no interfiere en la determinación de 2,4-DNP y porque son sustratos degradados por *R. opacus*. Ha sido demostrado que la presencia de compuestos orgánicos fácilmente biodegradables aumenta la velocidad de metabolización de nitrofenoles. En ensayos realizados en reactores *batch* secuenciales inoculados con *Jantnobacterium* sp. y una bacteria perteneciente al grupo actinomycete, Hess et al. (1990) demostraron que la velocidad de mineralización de 2,4-DNP se incrementa en presencia de glucosa. Asimismo, Schmidth et al. (1987) estudiaron el efecto de la glucosa en la cinética de degradación de p-nitrofenol por una cepa de *Pseudomonas* sp., obteniendo como resultado el aumento de la velocidad específica de degradación de p-nitrofenol. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que la presencia de glucosa (50 mg L^{-1}) o de piruvato de sodio (50 mg L^{-1}) no influye en la biodegradación de 0,54 mM de 2,4-DNP por *R. opacus* (Figura 4).

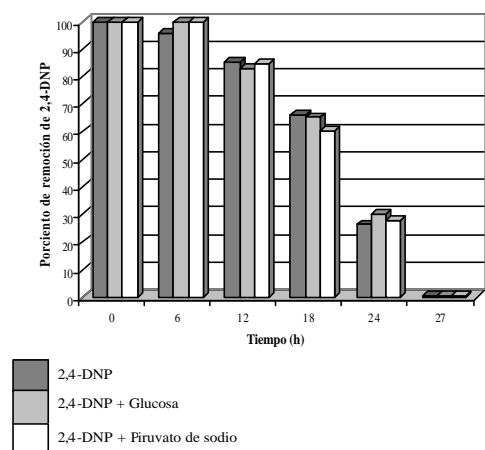
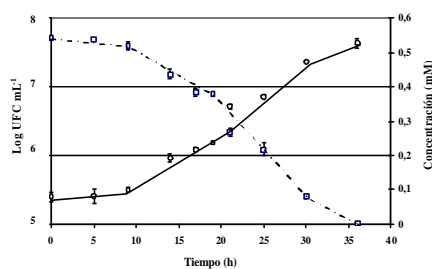
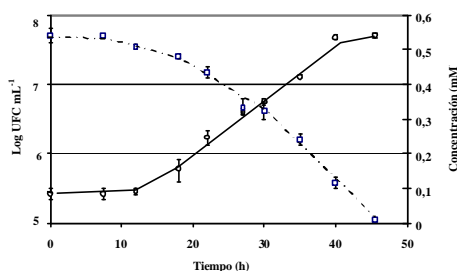


Figura 4. Degradación de 2,4-DNP (0,54 mM) por *R. opacus* en presencia de glucosa (50 mg L⁻¹) y piruvato de sodio (50 mg L⁻¹).

A)



B)



————— Crecimiento Bacteriano (Log UFC mL⁻¹)
 - - - - - Concentración 2,4-DNP (mM)

Figura 5. Degradación de 2,4-DNP (0,54 mM) por *R. opacus* en presencia de: A) fenol (50 mg L⁻¹), B) m-cresol (50 mg L⁻¹)

La biodegradación de 0,54 mM de 2,4-DNP en el efluente sintético conteniendo fenol (50 mg L⁻¹) o m-cresol (50 mg L⁻¹) se llevó a cabo en 36 y 46 horas,

respectivamente (Figura 5, A y B). Estos resultados permitieron demostrar que aún en presencia de compuestos análogos estructurales tóxicos *R. opacus* fue capaz de degradar 2,4-DNP en tiempos compatibles con tratamientos biológicos de efluentes líquidos y con procesos de biorremediación.

Los ensayos realizados en aguas superficiales a escala laboratorio demostraron que los microorganismos presentes no afectaron la cinética de

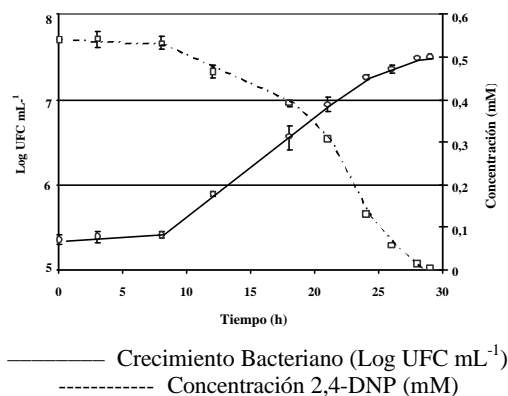


Figura 6. Degradación de 2,4-DNP (0,54 mM) por *R. opacus* en aguas superficiales a escala laboratorio.

degradación de 2,4-DNP por *R. opacus* (Figura 6). Estos resultados permiten inferir que la cepa bacteriana seleccionada conserva su capacidad degradativa aún en condiciones no favorables para su crecimiento y por lo tanto podría aplicarse en procesos de depuración y biorrecuperación.

En muestras tomadas al inicio y al final del proceso biodegradativo se comprobó la biodegradación completa de 2,4-DNP por HPLC (Figura 7 A y B). Asimismo, se demostró la ausencia de metabolitos orgánicos por cromatografía gaseosa realizada en muestras tomadas al final de la biodegradación del compuesto (Figura 8).

La aplicación de este estudio, permitirá la planificación de estrategias para la biorrecuperación de efluentes líquidos y biorremediación de aguas contaminadas con 2,4-DNP, minimizando el impacto ambiental que este compuesto produce.

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.

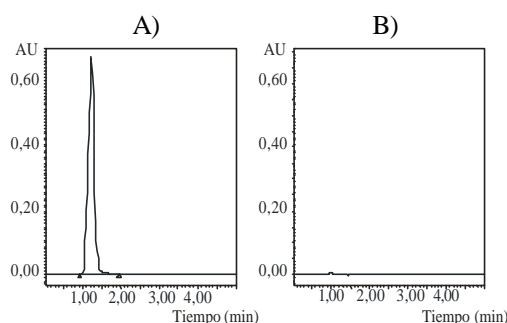


Figura 7. Degradación de 2,4-DNP (0,54 mM) por *R. opacus*. Cromatogramas HPLC. A) Inicio, B) Final.

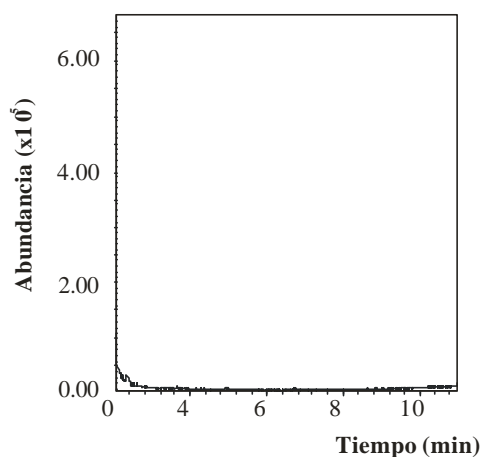


Figura 8. Degradación de 2,4-DNP (0,54 mM) por *R. opacus*. Cromatogramas CG-MS Final.

BIBLIOGRAFÍA

- APHA. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21th ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC.
- EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). (1980). *Ambient water quality for nitrophenols*. EPA-440/5 80-063, Washington, DC, USA.
- HESS T.F.; SCHMIDT, S.K.; SILVESTEIN, J.; HOWE, B. (1993). "Supplemental substrate

enhancement of 2,4-dinitrophenol mineralization by bacterial consortium". *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1551-1558.

- KAO, C.M.; LIU, J.K.; HEN, Y.L.; CHAI, C.T.; CHEN, S.C. (2005) "Factors affecting the biodegradation of PCP by *Pseudomonas mendocina* NSYSU". *J. Hazard. Mat.*, 124: 68-73.
- KARIM, K.; GUPTA, S.K. (2002). "Effect of alternative carbon source on biological transformation of nitrophenols". *Biodegradation.* 13: 353-360.
- KOROL, S.; ORSINGHER, M.; SANTINI, P.; MORETTON J., D'AQUINO M. (1989). "Biodegradation of phenolic compounds. II. Effects of inoculum, xenobiotic concentration and adaptation on *Acinetobacter* and *Pseudomonas phenol degradation*". *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 31: 117-120.
- PROVIDENTI, M.A.; LEE, H.; TREVORS J.T. (1993). "Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds". *J. Ind. Microbiol.* 12: 379-395.
- SCHMIDT, S.K.; SHOW, K.M.; ALEXANDER, M. (1987). "Kinetics of *p*-nitrophenol mineralization by *Pseudomonas* sp.: effects of second substrates". *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2617-2623
- SHE, Z.; GAO, M.; JIN, C.; CHEN, Y.; YU, J. (2005). "Toxicity and biodegradation of 2,4-dinitrophenol and 3-nitrophenol in anaerobic systems" *Process Biochem.* 40: 3017-3024.
- SPAIN, J.C.; VAN VELD, P.A. (1983). "Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure" *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 428-435.
- SPAIN, J.C. (1995). "Biodegradation of nitroaromatic compounds" *Annual Review of Microbiology.* 49: 523-555.
- YANG, C.F.; LEE, C.M.; WANG, C.C (2005) "Degradation of Chlorophenols Using Pentachlorophenol-Degrading Bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* in a Batch Reactor" *Current Microbiol.* 51. 156-160.
- ZABLOTOWICZ, R.M.; LEUNG, K.T.; ALBER, T.; CASSIDY, M.B.; TREVORS, J.T.; LEE, H.; VELDHUIS, L.; HALL, J.C. (1999). "Degradation of 2,4-dinitrophenol and selected nitroaromatic compounds by *Sphingomonas* sp. UG30". *Can. J. Microbiol.* 45: 840-848.