

DEGRADACIÓN DEL ALDRÍN POR *Bacillus licheniformis*, AISLADO DEL AGUA Y SEDIMENTO DE LA CIENAGA GRANDE DE SANTA MARTA, COLOMBIA

Degradation of Aldrin by *Bacillus licheniformis*, Isolated from Water and Sediment from the Ciénaga Grande, Santa Marta, Colombia

JOSÉ GREGORIO SÁNCHEZ DÍAZGRANADOS¹, Especialista en Ciencias Ambientales; CARLOS ANDRÉS HENRY LÓPEZ¹, Especialista en Ciencias Ambientales.

¹ Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andreis”-Invemar. Punta Betín, Santa Marta, Magdalena, Colombia. A.A. 1016. jsanchez@invemar.org.co

Presentado 2 de junio de 2010, aceptado 2 de junio de 2011, correcciones 28 de octubre de 2011.

RESUMEN

Con el objeto de apoyar la utilización de microorganismos endémicos como alternativa para la degradación de contaminantes orgánicos persistentes, se aisló la bacteria *Bacillus licheniformis*, a partir de muestras de sedimento y agua del complejo lagunar de la ciénaga Grande de Santa Marta (CGSM), Caribe colombiano, capaz de tolerar y degradar en condiciones aerobias el plaguicida organoclorado aldrín. La CGSM se encuentra impactada en los últimos años por descargas de residuos orgánicos provenientes de los ríos de la sierra nevada de Santa Marta (SNSM) y el Magdalena (RM). Debido a esta problemática se realizó un bioensayo en el que se expuso a *B. licheniformis* a una concentración de 60 ng/L de aldrín, durante un período de 30 días se evaluó la capacidad degradadora de la bacteria sobre el organoclorado. La determinación de las concentraciones de aldrín se realizó con la técnica de cromatografía de gases. Los resultados mostraron que *B. licheniformis* posee capacidad degradadora de 24% de aldrín y que factores como exposición a luz solar y volatilización influyen en la degradación del organoclorado con una reducción adicional de 31%.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, aldrín, biodegradación.

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus licheniformis* was isolated from sediment and water samples from estuary lagoon Cienaga Grande de Santa Marta (CGSM), Colombian Caribbean. The aim of the work was to use this microorganism as an alternative in the degradation of organic persistent pollutants. *B. licheniformis* was able to tolerate aerobic conditions and concentrations of the pesticide organochlorine, aldrin. The test was made during 30 days with 60 ng/L of aldrin in order to evaluate the degradation capacity of this bacterium. Identification and isolation of *B. licheniformis* was made through morphological (Gram

test), as well as biochemical characterization (BBL Crystal system). Aldrin concentration was determined by gas chromatography. Results show that *B. licheniformis* had a degradation capacity of 24% from total concentration. Factors like solar light exposition and volatilization had an extra influence of 31% on aldrin degradation.

Key words: *Bacillus licheniformis*, aldrin, biodegradation.

INTRODUCCIÓN

La descarga de contaminantes orgánicos en ecosistemas acuáticos costeros afecta a los organismos residentes debido a su extrema susceptibilidad y baja tolerancia a estos tóxicos (Escobar, 2002). El uso inadecuado de contaminantes orgánicos persistentes, como los plaguicidas organoclorados, el desconocimiento de efectos colaterales, la falta de información sobre sus características sobre el ambiente y la ausencia de políticas claras sobre sus aplicaciones en países en vía desarrollo, han contribuido a alteraciones de los ecosistemas y aumento del factor de riesgo para los seres vivos por lo cual se hace necesario la implementación de planes de manejo para su uso y aplicación (Atlas y Bartha, 2001). Los efectos sobre la salud humana producidas por los plaguicidas dependen de la dosis, vía de administración y tiempo de exposición. Los efectos agudos (vómitos, diarrea, aborto, cefalea, somnolencia, alteraciones comportamentales, convulsiones, coma, muerte) están asociados a accidentes donde una única dosis alta es suficiente para provocar intoxicación. En contraste los efectos crónicos (cánceres, leucemia, necrosis de hígado, malformaciones congénitas, neuropatías periféricas, a veces solo malestar general, cefaleas persistentes, dolores vagos) se deben a exposiciones repetidas y los síntomas o signos aparecen luego de un largo tiempo (hasta años) de contacto con el pesticida, dificultando su detección. Dado que su biotransformación es muy lenta, los pesticidas provocan efectos acumulativos en las personas expuestas (Gómez, 2003; Plenge-Telleche *et al.*, 2007).

En los últimos años se han empleado microorganismos como bacterias y hongos para inducir degradación de compuestos tóxicos, orgánicos e inorgánicos, presentes en agua y sedimentos, con el fin de convertirlos en sustancias más sencillas y menos dañinas al ambiente (Dua *et al.*, 2002). Se han aislado microorganismos aeróbicos que degradan plaguicidas organoclorados como el aldrín. Otros microorganismos anaeróbicos que necesitan mayor tiempo para realizar el proceso de degradación. Entre los microorganismos degradadores se destacan: *Bacillus* sp., *Pseudomona* sp. y consorcios microbianos (El-Fantroussi, 2000). La biodegradación es actualmente considerada como la alternativa menos costosa para transformar física y químicamente contaminantes presentes tanto en agua como en suelo debido a que gran variedad de bacterias cuentan con la maquinaria enzimática para transformar compuestos xenobióticos (Gómez, 2003).

METODOLOGÍA

TOMA DE MUESTRAS

Se escogieron las estaciones río Sevilla (RSE), centro de la Ciénaga (CEN) y Boca Caño Clarín (BCC), para la toma de muestras de agua y sedimento, debido a que se

estéril de 500 mL completando el volumen con medio de sales mínimas, el cual contenía NaCl 0,8 g/L, NH₄Cl 1 g/L, KCl 0,1 g/L, KH₂PO₄ 0,1 g/L, MgSO₄·7 H₂O 0,2 g/L, CaCl₂·2 H₂O 0,04 g/l, melaza 5g/L y una concentración de aldrín de 60 ng/L (Gómez, 2003), obteniendo de esta forma un preinóculo con una relación de 9:1 de células activas para el tratamiento y el blanco.

FASE II. COMPORTAMIENTO DE *B. LICHENIFORMIS* FRENTE AL ALDRIN

En esta etapa se observó el comportamiento de *B. licheniformis* frente a una concentración de 60 ng/L de aldrín. Se realizó un blanco reactivo por triplicado (500 mL de medio de sales mínimas más 60 ng/L de aldrín). Se tomaron muestras por duplicado a los tratamientos para recuento de células viables por el método de siembra en placa en ANA₆₀ los días 0, 15, 30 del período de incubación y la cuantificación de las concentraciones de aldrín.

FASE DE LABORATORIO DE QUÍMICA

La extracción de los residuos de plaguicidas organoclorados de las muestras provenientes de los ensayos, se realizaron por medio del método UNESCO, 1984 – extracción líquido-líquido, cromatografía de gases ECD. El método se fundamenta en la extracción sucesiva con mezclas de hexano-éter:

- a) Cada tratamiento se traspasó a un embudo de separación de 2000 mL, al cual se le adicionaron 50 mL de hexano-éter 15%.
- b) Se agitó vigorosamente durante 3 minutos, dejando reposar por 1 minuto, se separaron las dos fases, el sobrenadante se recogió en un erlenmeyer de 250 mL (primera extracción).
- c) La fase acuosa se traspasó nuevamente al embudo de separación adicionándole 50 mL de solución de hexano-éter a 6%; agitando vigorosamente por 3 minutos y el sobrenadante se recogió en el erlenmeyer (segunda extracción).
- d) Una vez contenidas en el erlenmeyer, se le adicionó a las extracciones, sulfato de sodio anhídrido (Na₂SO₄), dejándolo por una hora con el fin de que adsorbiera la humedad. El extracto se concentró en un rotavapor hasta 0,5 mL y se purificó en columna de florisil: se pasó el extracto por la columna de florisil y se adicionaron 20 mL de éter-hexano a 6% (separación del aldrin) y se recogió en un erlenmeyer. Luego se adicionaron a la columna 20 mL de éter-hexano 15%, obteniendo así la segunda fracción (separación de dieldrin). Se hizo una tercera extracción (separación de plastificantes). Se concentró el extracto en el rotavapor hasta 1 mL y se le adicionó 1 mL de H₂SO₄, se agitó vigorosamente durante 30 segundos, se esperó hasta que se formaron dos fases (fase orgánica y fase acuosa conteniendo el ácido y las impurezas). Se retiró con una pipeta Pasteur la fase ácida, agregándole nuevamente ácido hasta que el extracto permaneciera completamente translúcido e incoloro. Se lavó cada fracción del extracto, adicionándole 1 mL de agua destilada para limpiar el exceso de ácido. Se retiró el agua con pipeta Pasteur conservando de esta manera la muestra tratada. Se adicionó cobre metálico para desulfurar el extracto, por un tiempo de 4 h. Los extractos se analizaron por cromatografía gas – líquido con un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem con programa térmico de rampa según los siguientes parámetros instrumentales, dotado con un detector de captura de electrones (ECD): temperatura inicial: 150 °C;

temperatura final: 290 °C; tiempo inicial: 4 min; presión en la columna: 15 psi; gradiente térmico: 7 °C/min; gas de arrastre: Nitrógeno 99,995%; columna capilar: Supelco SPB - 1 Make- up: 60 mL/min; temperatura del inyector: 220 °C y temperatura del detector ECD: 310 °C. Como patrón de comparación se emplearon soluciones estándar de organoclorados puros - Supelco - (INVEMAR, 2000).

El porcentaje de biodegradación por *B. licheniformis*. Se determinó mediante ecuación (1):

$$\%DBI = \{ [1 - (\text{Conc. A-Bl}t30/\text{Conc. A-Bl}t0)] - [1 - (\text{Conc. A-BR}t30/\text{Conc. A-BR}t0)] \} \times 100 \quad (1)$$

Donde: %DBI = porcentaje de degradación de aldrín por *B. licheniformis*; Conc. A-Bl t-30 = concentración de aldrín remanente en el tratamiento con *B. licheniformis* a 30 días; Conc. A-Bl t-0 = concentración de aldrín remanente en el tratamiento con *B. licheniformis* a 0 días; Conc. A - BR t-30 = concentración de aldrín remanente en el tratamiento blanco de reactivo a los 30 días; Conc. A - BR t-0 = concentración del aldrín remanente en el tratamiento blanco de reactivo al día.

RESULTADOS

IDENTIFICACIÓN *B. LICHENIFORMIS*

Se obtuvieron 52 cepas bacterianas de los sedimentos y aguas de las estaciones de muestreo de la CGSM. De estas cepas 16 sobrevivieron a la concentración de 60 ng/L de aldrín y 3 cercanas a la bacteria nativa *B. licheniformis*, la cual se identificó por medio de sus características macroscópicas, microscópicas y por pruebas bioquímicas.

FASE II. COMPORTAMIENTO DE *B. LICHENIFORMIS* FRENTE AL ALDRÍN

La figura 2 muestra los tiempos de retención del patrón de aldrín a 10,81 minutos y dieldrín a 13,82 minutos, para la identificación de estos en los diferentes tratamientos.

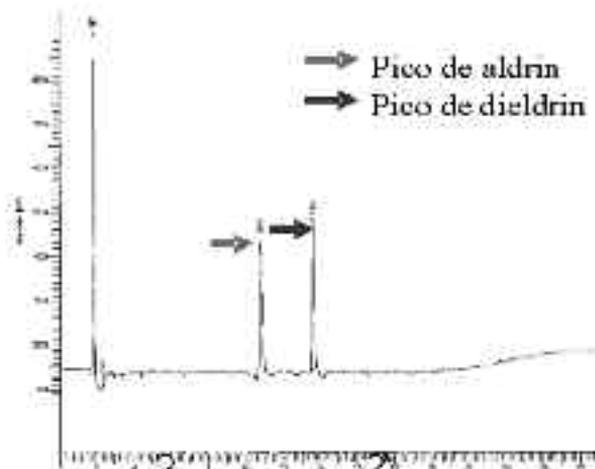


Figura 2. Cromatograma esquematizando el patrón de aldrín y dieldrín. En el eje de las abcisas: tiempo de retención (minutos) y eje de las ordenadas: respuesta (mV).

Se realizaron recuentos de *B. licheniformis* en los días 0, 15 y 30 observando decrecimiento en las etapas logarítmica y de decaimiento en el crecimiento de esta bacteria (Tabla 1). A partir del montaje del bioensayo en el cual se inocularon 60 ng/L (100%) de aldrín, se estableció un porcentaje de recuperación para el método de 86,2%, dada la pérdida de organoclorado por procesos químicos para obtener los extractos. Por esta razón, se analizaron los valores obtenidos desde una concentración de 51,4 ng/L de aldrín, el cual se estableció con el promedio de los datos obtenidos en el tiempo inicial (0 días) para el blanco de reactivo y la cepa.

Cepa	Tamaño	Gram	Forma	Elevación	Margen	Color	Superficie	Consistencia
<i>Bacillus licheniformis</i>	Grande	Bacilo gram+	Irregular	Plana	Rizado	Beige	Brillante	Cremoso

Tabla 1. Características morfológicas de las cepas tolerantes a 60 ng/L de aldrín.

Con los valores promedio de concentración de aldrín de los días 0, 15 y 30, calculados a partir de los cromatogramas para los extractos obtenidos del blanco de reactivo se obtuvieron promedios de $T_0 = 51,4$ ng/L, $T_{15} = 44,6$ ng/L y $T_{30} = 35,6$ ng/L y los tratamientos con *B. licheniformis* de $T_0 = 50,5$ ng/L, $T_{15} = 26,5$ ng/L y $T_{30} = 23,4$ ng/L (Tabla 2) se determinó un porcentaje de degradación del plaguicida por esta bacteria de un 24%.

<i>Bacillus licheniformis</i>	
Tiempo (Días)	UFC
0	5,0 E + 06
15	4,5 E + 08
30	1,0 E + 06

Tabla 2. Promedio de recuento en placa (UFC) *B. licheniformis* durante el período de incubación.

Considerándose que la primera parte de la ecuación, $[1 - (\text{Conc. A-BI } t-30 / \text{Conc. A-BI } t-0)] \times 100$, hace referencia a la degradación total (55%), correspondiente a los factores bióticos y abióticos que influenciaron en la remoción del aldrín. Mientras que la segunda parte, $[1 - (\text{Conc. A - BR } t-30 / \text{Conc. A-BR } t-0)] \times 100$, representa la degradación abiótica del organoclorado (31.0%) como se muestra en la figura 3A.

DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN *B. LICHENIFORMIS*

Los bacilos Gram positivos se caracterizan por formar esporas, que son estructuras resistentes producidas cuando el microorganismo se encuentra en condiciones adversas o de estrés que no le permiten su desarrollo normal; en el caso que nos atañe, la presencia de contaminantes orgánicos en las estaciones monitoreadas, en las que se han reportado contenidos de residuos organoclorados totales en sedimentos durante el año 2002 del orden de 1,81 ng/g y 0,92 ng/g aldrín (INVEMAR, 2002).

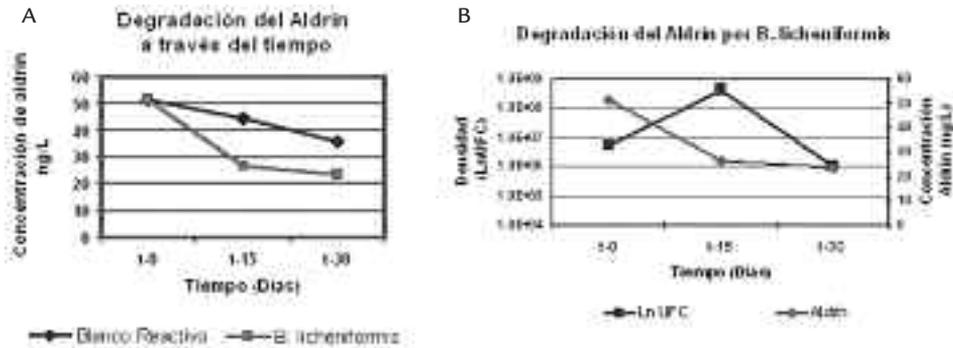


Figura 3. A. Degradación biótica /abiótica y abiótica del Aldrín a través del tiempo. B. Degradación del aldrín por *B. licheniformis* a través del tiempo.

FASE II. COMPORTAMIENTO DE *B. LICHENIFORMIS* FRENTE AL ALDRÍN

En las figura 3B y tabla 2, se muestra como *B. licheniformis* presentó un crecimiento logarítmico a los 15 días, al igual que un aumento en la degradación de aldrín por esta bacteria. Posteriormente la densidad bacteriana experimentó un descenso, explicando así la disminución de la intensidad de la degradación del aldrín entre los días 15 y 30. A los 30 días de tratamiento se obtuvo degradación de 24% de aldrín por *B. licheniformis*, el cual también ha sido aislada en otras investigaciones a partir de ambientes impactados con contaminantes orgánicos, en los cuales se determinó que tiene capacidad degradadora de 12% de sustancias inhibitoras de hidratación de arcillas en pozos de perforación de petróleo *B. licheniformis* ha sido reportado como productor de biosurfactantes, sustancias que ayudan a facilitar la adsorción de moléculas hidrofóbicas a la célula (Salamanca *et al.*, 2003). Posiblemente, esta capacidad le favoreció para la degradación del plaguicida. La producción de estas sustancias facilita la transformación de compuestos tóxicos orgánicos inmiscibles en el medio de cultivo líquido (pesticidas y bifenilos policlorados), porque aumentan la adherencia de enzimas inespecíficas, que podrían producir estas bacterias, para tener mayor contacto con la molécula de aldrín, como lo reportaron Samanta *et al.*, 2002; así mismo en otros lugares se han aislado bacterias degradadoras de plaguicidas clorados, a partir sedimentos estuarinos, como en el lago Maruiut, Alexandria (El-Bestawy *et al.*, 2000).

Los productos intermedios son en la mayoría de los casos más tóxicos que el inicial, y tienen el potencial de afectar sustancialmente poblaciones, produciendo una disminución en su densidad del orden de 21×10^3 UFC/mL (Gómez, 2003). En varios estudios se ha obtenido formación de tóxicos intermedios estables como resultado de la actividad microbiana, en procesos de oxidación de compuestos ciclodienos, los cuales son en muchos casos más tóxicos que el compuesto original (PCP, 2002). Así mismo, se ha reportado la formación de un epóxido estable, como metabolito secundario de la degradación microbiana del plaguicida heptacloro, debido a hidrólisis química con cultivos mixtos incluyendo los géneros *Bacillus*, *Nocardia*, *Penicillium* y *Fusarium* (MacRae, 1989).

La figura 3B muestra reducción del plaguicida organoclorado aldrín por efectos abióticos, como consecuencia de procesos fotoquímicos y pérdida por volatilización, debido a que las botellas del bioensayo estuvieron expuestas a luz del día y presentaban un

orificio de ventilación en la parte superior a fin de mantener las condiciones aerobias. Varios procesos abióticos pueden contribuir a la degradación medio ambiental de aldrín, la alta reactividad del hidroxilo y otros radicales libres atmosféricos podrían jugar un papel en la degradación de este plaguicida (EPA, 2002). Por otra parte, este ciclodieno es susceptible a reacciones fotoquímicas de irradiación por luz solar o UV, bajo las condiciones de laboratorio y se presentan procesos de epoxidación y transformaciones de isomerización que producen la formación de fotoaldrín (EPA, 2002). Estudios realizados por Verschueren (EPA, 2002) sobre la persistencia de aldrín en agua de río mantenida en frascos sellados, expuestos a luz solar y en condiciones de luz fluorescente artificial, mostraron que al cabo de un mes, solo quedaba el 40% de la concentración inicial. Otro estudio en suelos, estableció una permanencia de aldrín de 56% después de 30 días de adicionar 1,5 kg/Ha en un terreno inundado (EPA, 2002). De igual forma, se ha demostrado la pérdida relativamente rápida de aldrín en suelo, durante los primeros meses de aplicación, atribuida principalmente a procesos de volatilización (EPA, 2002). Más aún, se han comprobado mecanismos de remoción abiótica por efecto de la luz, de alrededor de 8,5% en la transformación de petróleo (Rojas *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

La degradación de aldrín en el bioensayo fue influenciada por la interacción entre *B. licheniformis* y factores abióticos.

La bacteria *B. licheniformis* aislada de la CGSM, presentó 24% de degradación de la concentración inicial de aldrín.

Se evidenció 31% de degradación del plaguicida organoclorado aldrín por factores abióticos, como consecuencia de procesos fotoquímicos y pérdida por volatilización.

BIBLIOGRAFÍA

ATLAS R, BARTHA R. Ecología microbiana microbiología ambiental. España , Editorial Pearson S.A.; 2001.

DUA Y, SINGH A, SETHUNATHAN NY, JAHRI A. Biotechnology and bioremediation success and limitations. *Appl Microbiol Biot.* 2002;59:143-152.

EL-BESTAWY E, MANSY A, EI-KOWEIDY. Biodegradation of selected Chlorinated contaminating Lake Maruiut ecosystem. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2000;3(10):1673-1680.

EI-FANTROUSSI S. Enrichment and Molecular Characterization of a bacterial That Degrades Methoxy-Methyl Urea Herbicides and their Aniline Derivatives. *Appl Environ Microb.* 2000;66(12):5110-5114.

EPA. Environmental Protection Agency. Health Effects Support Document for Aldrin/Dieldrin. Washington, Division Washington DC 20460 & Science International IC; 2002.

ESCOBAR J. La contaminación de los ríos y sus efectos sobre la áreas costeras y el mar. Serie Recursos Naturales e Infraestructura. Santiago de Chile, CEPAL; 2002.

GÓMEZ M. Selección de un Consorcio Bacteriana Aeróbico de la Ciénaga Grande de Santa Marta, con Capacidad degradadora del Plaguicida Organoclorado

Aldrin; 2003.

INVEMAR. Monitoreo de las condiciones ambientales y los cambios estructurales y funcionales de las comunidades vegetales y de los recursos pesqueros durante la rehabilitación de la Ciénaga Grande de Santa Marta; 2000.

INVEMAR. Monitoreo de las condiciones ambientales y los cambios estructurales y funcionales de las comunidades vegetales y de los recursos pesqueros durante la rehabilitación de la Ciénaga Grande de Santa Marta: un enfoque adaptativo; 2002.

MACRAE I. Microbial metabolism of pesticides and structurally related compounds. *Rev Environ Contam T.* 1989;109:1-87.

PCP: Persistent Chlorinate Pesticides. 2002. (Citado 18 Abril 2002). Disponible en URL www.cfr.washington.edu/classes/esc.518/lectures-/perssistent%20pesticides.

PLENGE-TELLECHEA F, SIERRA-FONSECA J, CASTILLO-SOSA Y. Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas. *Human health risks caused by pesticides.* México. *Tecnociencia*; 2007;1(3):4-6.

ROJAS A, RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ R, ENRÍQUEZ-VILLANUEVA F, MARTÍNEZ-CRUZ J, POGGI-VARALDO H. Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil. *Resour Conserv Recy.* 1999;27:15-26.

SALAMANCA G, LUNA V, GUTIÉRREZ J. Valoración de la degradación de un inhibidor de hidratación de arcillas, empleado en la perforación de pozos de petróleo, por *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas stutzeri*. *Memorias IV Congreso Internacional de Microbiología Ambiental.* Pontificia Universidad Javeriana; 2003:15-18.

SAMANTA SK, SINGH O, JAIN RK. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental Pollution and Biorremediation. *Trends Biotechnol.* 2002;20(6):243-248.

UNESCO. Manuales y guías n.º 13 de la COI. Manual para la vigilancia del aceite y de los hidrocarburos del petróleo disueltos/dispersos en el agua de mar y en las playas; 1984.

