

## BIODEGRADACION DE BIFENILOS POLICLORINADOS (PCB'S) POR ACTIVIDAD BACTERIANA

## BIODEGRADATION OF POLICHLORINATED BIPHENYLS (PCB'S) BY BACTERIAL ACTIVITY

*Bastardo, Héctor*

Instituto de Zoología Tropical U.C.V. P.O Box 47058, Caracas 1041-A Venezuela email: hbastardo@cantv.net.

### RESUMEN

Los bifenilos policlorinados (PCB's), son compuestos químicos orgánicos sintéticos, contaminantes persistentes. Se caracterizan, por tener una apariencia de aceite pesado, alto punto de ebullición, gran estabilidad química, alto punto de ignición, conductividad eléctrica baja, y baja solubilidad en el agua, son usados como plastificadores, lubricantes y aditivos de fluidos de corte. Pueden causar lesiones superficiales y crónicas en la piel ya que su baja solubilidad en el agua, permite su acumulación en tejidos grasos. Recientes investigaciones han demostrado que los PCB's pueden ser degradados en el ambiente por actividad bacteriana. En este trabajo se usaron gremios de bacterias asociadas a suelos contaminados con PCB's. Se aislaron y caracterizaron 4 grupos de bacterias, las cuales se ubicaron en grupos funcionales con la capacidad de soportar niveles altos de salinidad 1, 5, 10 y 50 partes por mil de NaCl, además de presentar capacidad para degradar PCB's por liberación de iones cloruros en el agua. La cinética de crecimiento del grupo funcional P1 fue estudiada durante 30 días en un set de concentraciones de PCB's que oscilaba entre 10, 15 y 30 ppm. Los resultados obtenidos señalan que las bacterias son capaces de degradar las moléculas de PCB's lo cual fue reportado como un aumento de los iones cloruro en solución acuosa. De estos resultados se puede deducir que para concentraciones de 15 ppm de PCB's en la solución acuosa, se observa la mayor cinética de crecimiento, así como la mayor concentración de iones cloruro en el medio acuoso.

### ABSTRACT

Polichlorinated biphenyls (PCB's), are synthetic organic chemicals, which are persistent pollutants. They have the following characteristics: a heavy oil appearance, high boiling point, high chemical stability, high flash point, low electrical conductivity, and low water solubility, were also used as plasticizers and additives in lubricating and cutting fluids. PCB's also cause chronic skin lesions, and their low water solubility increase your accumulation in lipid tissues. Recent research has shown that PCB's do biodegrade in the environment. In this work we use of bacterial pools associated to PCB's contaminated soils. Isolated bacteria were characterized and grouped in functional groups with the possibility to undergoing high levels of salinity 1, 5, 10 and 50 parts per million of NaCl, capable to degrade PCB's by liberation of chloride ions into the water. The kinetic of growth of the P1 functional group of bacteria was studied during 30 days in a set of PCB's concentrations between 10, 15 and 30 ppm. Results show that bacteria are capable to degrade PCB's structure, which was reported as the increase of the Cl ions in water solution. These results permit shown that to concentration of PCB's of 15 ppm in the aqueous solution, is showing the maximal concentration of Cl ions in the water and also the bacterial population in this time shows the higher growing.

**PALABRAS CLAVES:** Biorremediación, PCB's, Biodegradación, Grupos Funcionales Bacterianos

**KEY WORDS:** Biorremediation, PCB's, Biodegradation, Bacterial Functional Groups

### INTRODUCCION

Los bifenilos policlorinados (PCB's), son una amplia familia de compuestos químicos orgánicos muy tóxicos y extremadamente persistentes debido a su gran resistencia a la degradación, estas características los ubican dentro de la categoría de

residuos tóxicos peligrosos, por lo que se hace necesaria su extracción o eliminación cuando son derramados o esparcidos en el ambiente. Estos compuestos, se producen sintéticamente de la unión de uno o más átomos de cloro a una molécula de bifenilo, poseen una fórmula química de  $C_{12}H_5Cl_n$ , siendo los más usados aquellos que contienen en-

tre un 40 y 55 % de Cloro, son líquidos pesados, de una consistencia oleaginosa, con un alto grado de estabilidad química, baja solubilidad en agua, baja presión de vapor y alta capacidad térmica. Estas características los hicieron comercialmente atractivos para ser usados como fluidos dieléctricos en transformadores de la industria eléctrica. Los PCB's fueron usados además como plastificadores y aditivos en lubricantes y aceites de corte. Es conocida la acción letal de los PCB's en los organismos vivos, son causantes de enfermedades crónicas, desorden gástrico y lesiones en la piel en humanos y animales de laboratorio. Además su baja solubilidad en el agua permite que se acumulen en tejidos grasos, lo que los hace probables fuentes cancerígenas en humanos. A partir de los años 70, se han creado a nivel mundial legislaciones federales con el objeto de eliminar la distribución comercial de los PCB's (PCB's.ECO-PRSSQ. 1988).

En Venezuela la Ley Penal del ambiente obliga a su eliminación a través de un adecuado manejo, disposición y eliminación, siendo la forma más común de eliminación la incineración. Es conocido el hecho de que existen organismos que son capaces de modificar, degradar o mineralizar este tipo de compuestos. Así, se puede decir que la participación de los microorganismos en la degradación es factible y que ocurre debido a la producción de enzimas que incrementan la tasa de ciertas reacciones químicas, modificando estos compuestos químicos a estructuras complejas simples que pueden ser utilizadas como sub-unidades estructurales de la célula bacteriana o bien como generadoras de energía para otras reacciones (Linden D. and Z. Sun.1998, Chan y Col., 1998). Estos investigadores encontraron que un grupo de bacterias del género *Pseudomonas* sp., son capaces de iniciar la degradación de estos compuestos por adición de oxígeno molecular al anillo bencénico, señalando además que la persistencia de los PCB's en el ambiente incrementa con la cantidad de ión cloruro presente en la molécula. Así, los mono-, di- y tri bifenilos clorinados se degradan relativamente rápido. Los tetraclorinados lentamente y los altamente clorinados, son resistentes a la biodegradación.

En este trabajo se realizaron ensayos con una mezcla de PCB's usados en la industria eléctrica

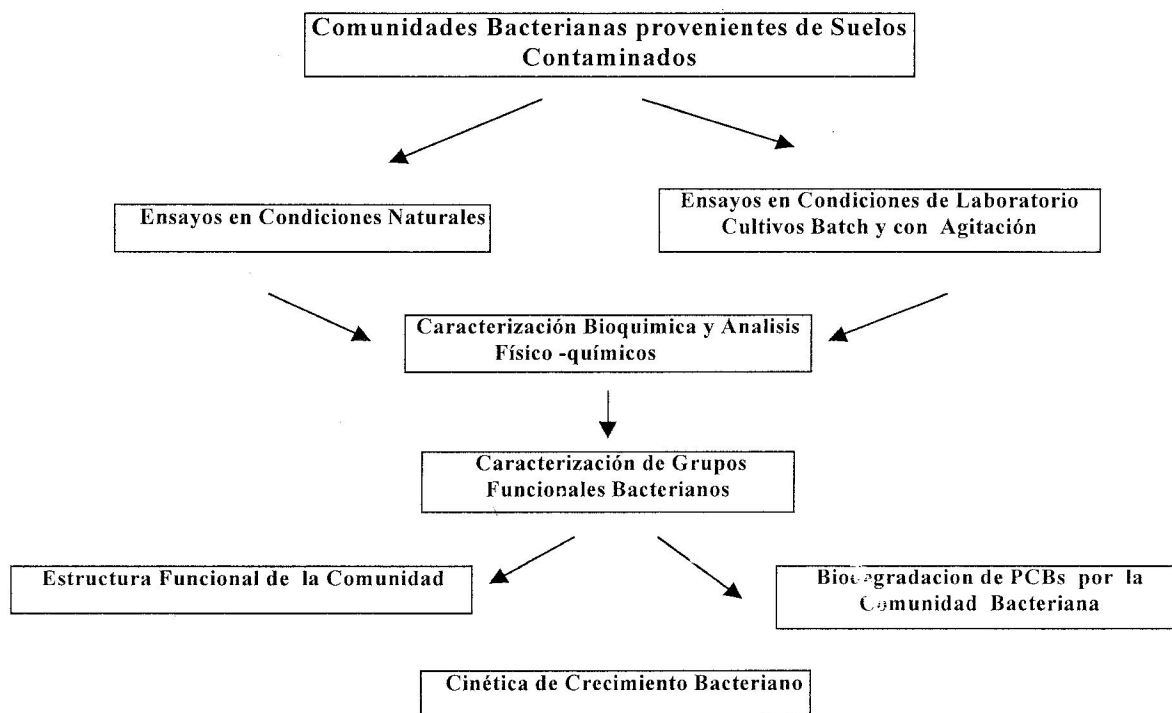
con el objeto de buscar posibles vías de biodegradación de los PCB's, mediante el uso de gremios de bacterias capaces de tolerar altas concentraciones de PCB's, así como de romper los enlaces clorados de los bifenilos con la posterior degradación de éstos como una manera de eliminar así el efecto tóxico de estas sustancias químicas, permitiendo un fácil manejo y disposición sin alteraciones ambientales.

## MATERIALES Y METODOS

Muestras de una mezcla de PCB's con 300 ppm de concentración, provenientes de transformadores eléctricos fueron incubadas en un medio nutritivo por un período de siete días con el objeto de recuperar bacterias asociadas a éstos. Luego de este lapso de tiempo, se procedió a aislar por agotamiento un promedio de 25 unidades formadoras de colonias (u.f.c.), a las cuales se les hizo un conjunto de 12 pruebas bioquímicas con el objeto de caracterizarlas y agruparlas funcionalmente, tomando en cuenta características particulares para la degradación de compuestos aromáticos recalcitrantes, como es el caso de los PCB's, además de observar la posibilidad de cada uno de los grupos funcionales obtenidos para producir compuestos tenso-activos, dentro de estas podemos señalar las siguientes: beta-hemólisis, actividad ureásica, lipolítica, oxidasa, etc. (Chan y Col., 1998; Bastardo y Col., 1993).

Con los resultados obtenidos, se procedió mediante una prueba estadística de agrupamiento a separar los grupos funcionales presentes en la muestra. Se realizaron ensayos con el objeto de observar la cinética de crecimiento para cada uno de los cuatro grupos funcionales obtenidos. Simultáneamente se analizaron los cambios de algunos parámetros físico-químicos (pH, Conductividad, Tensión Superficial y liberación de cloruros en el medio acuoso) durante la degradación de PCB's utilizando los diferentes grupos funcionales de bacterias aislados. Se estudiaron además los niveles de tolerancia a diferentes concentraciones de Cloruro de sodio (0.1, 0.5, 1 y 5 % de NaCl). Como una forma de observar la capacidad degradativa de PCB's por actividad bacteriana, se determinó la cinética de crecimiento del grupo funcional P1 sometido a diferentes concentraciones de PCB's (10, 15 y 30 ppm).

## ESQUEMA METODOLOGICO



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tomando en cuenta la capacidad que poseen las bacterias para degradar hidrocarburos poliaromáticos (PAH), se realizaron experimentos con el objeto de aislar unidades formadoras de colonias (u.f.c.) asociadas a una mezcla de PCB's proveniente de condensadores eléctricos. La concentración de PCB's en esta mezcla fué de 300 ppm, se aislaron al azar un total de 25 u.f.c. a las cuales se les realizaron 12 diferentes pruebas bioquímicas. Los resultados obtenidos dieron una visión integral de la capacidad

enzimática de estas bacterias para degradar estructuras orgánicas específicas lo cual a su vez permitió establecer una relación directa entre la actividad fisiológica de éstas y la estructura química de los complejos orgánicos sometidos a estudio.

Luego de analizados los resultados obtenidos se procedió a establecer la relación entre cada una de las unidades formadoras de colonias con cada tipo de sustrato, así como su capacidad para tolerar concentraciones extremas de salinidad y la actividad hemolítica, prueba indicadora de su capacidad de producir metabolitos tensoactivos

Tabla 1. Grupos funcionales aislados de suelos impregnados con PCB's analizados.

GF.	Citrato	Acetato	Urea	Halofílicas	Act.Lipolítica
1	+	+	+	+	+
2	+	-	-	+	+
3	-	-	-	-	+
4	+	+	+	-	+

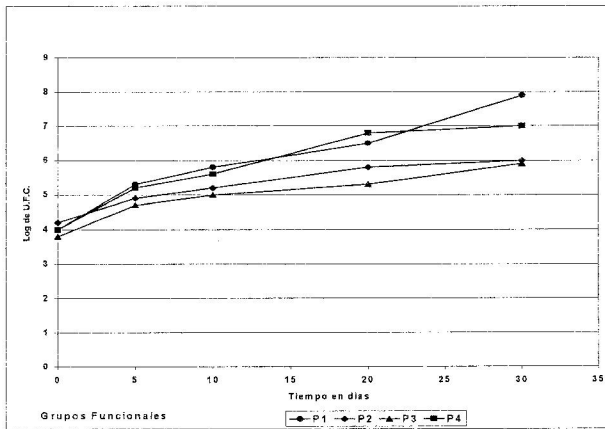


Figura 1 Cinética de Crecimiento de Diferentes Grupos Funcionales de Bacterias durante la Degradación de PCBs.

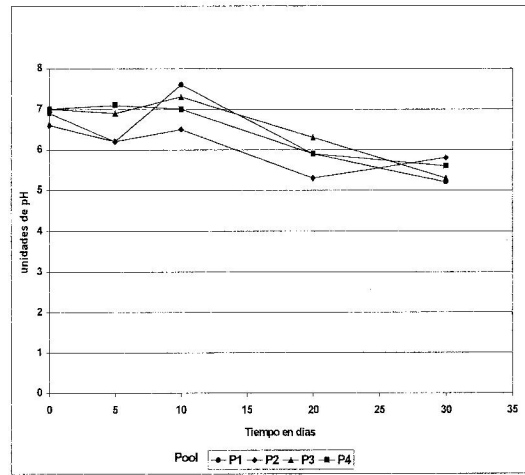


Figura 2. Cambios en el pH durante la biodegradación de PCB

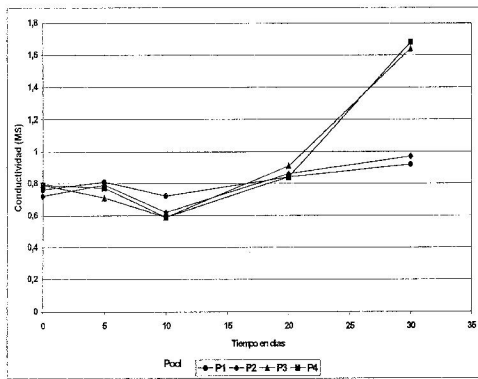


Figura 3. Cambios en la Conductividad del Agua durante la Biodegradación de PCBs.

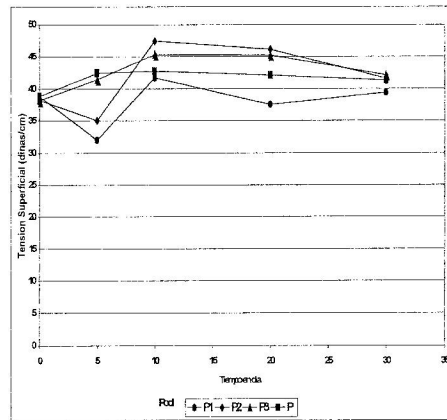


Figura 4. Cambios en la Tensión Superficial durante la Biodegradación de PCBs.

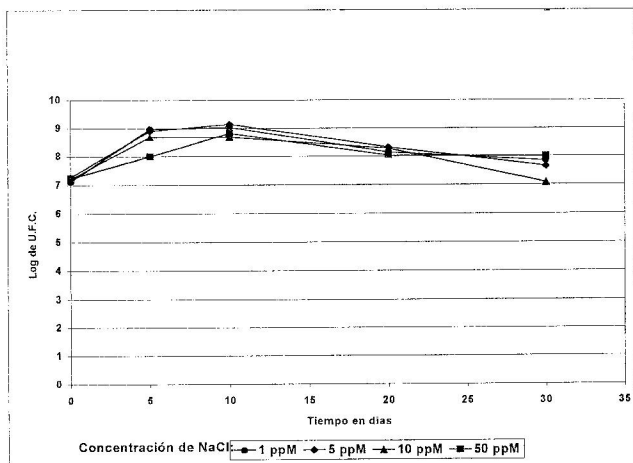


Figura 5. Cinética de Crecimiento Bacteriano bajo diferentes concentraciones de NaCl.

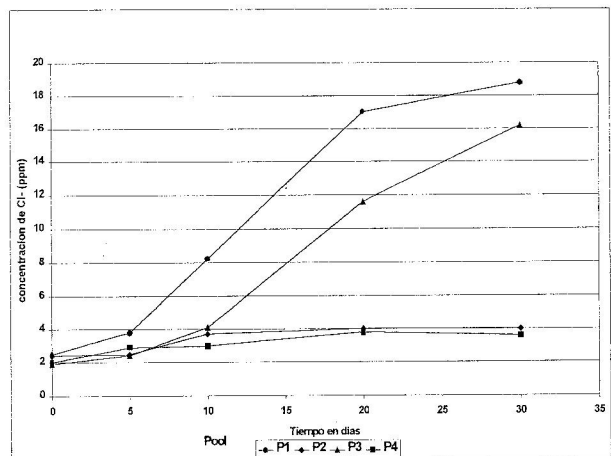


Figura 6. Cambios en la concentración de Cl<sup>-</sup> durante la biodegradación de PCBs.

Estos resultados permitieron establecer una relación entre las diferentes unidades formadoras de colonias, tomando en cuenta su similitud de actividad enzimática frente a los diferentes sustratos analizados. De aquí se procedió por medio de manejos estadísticos de agrupamiento a establecer una relación entre cada una de las u.f.c. y su comportamiento fisiológico, en este sentido, se puede señalar que los análisis estadísticos de agrupamiento, permitieron encontrar cuatro grupos funcionales de bacterias con características bioquímicas particulares para cada grupo (Tabla 1)

Los resultados presentados en la Tabla 1, señalan los 4 grupos funcionales o gremios de bacterias aisladas provenientes de los suelos contaminados con PCB's, lo cual, de acuerdo a la capacidad enzimática para degradar sustratos característicos, sugiere que estos grupos de bacterias pueden ser usadas como organismos degradadores de PCB's, tomando en cuenta además que su presencia en estos suelos los ha hecho resistentes a diferentes concentraciones de PCB's. Este hecho conduce a señalar que las bacterias en un momento dado pueden utilizar como recurso energético estos compuestos orgánicos. Tomando en cuenta esta premisa, se procedió a determinar la cinética de crecimiento de los diferentes grupos funcionales identificados, con el objeto de observar cual de estos presentaba el mayor crecimiento y por ende mayor habilidad para utilizar como fuente de energía la mezcla de PCB's. En la figura 1 se puede observar la cinética de crecimiento de los cuatro grupos funcionales seleccionados. De acuerdo al incremento poblacional de los diferentes grupos funcionales, se puede señalar que durante los primeros diez días de exposición no se observan diferencias significativas en la dinámica de crecimiento, sin embargo a partir de allí, se pueden separar dos grupos: (P1 y P4) incrementan su crecimiento en comparación con (P2 y P3) quienes observan la tendencia a estabilizarse con un leve incremento hacia los 30 días de ensayo. De los 4 grupos funcionales P1 y P4 mantienen su crecimiento exponencial, observándose un ligero incremento hacia finales del experimento por parte del gremio P1, lo que indica que es el grupo funcional con mayor potencialidad de crecimiento bajo las condiciones estudiadas.

Además de observar el crecimiento bacteriano, se procedió a determinar los cambios de algunos parámetros físico-químicos que ocurrían en la solución acuosa (pH, Conductividad, Sólidos disueltos totales, Tensión Superficial y liberación de cloruros en el medio acuoso) durante la degradación de PCB's.

En la Figura 2 se pueden observar los cambios en el pH de la solución durante los ensayos, allí encontramos que el pH para los 4 grupos funcionales no presenta cambios significativos a excepción del grupo P2, el cual hasta los 20 días de exposición presenta los valores más bajos de pH, sin embargo a finales del experimento alcanza el máximo valor. El máximo incremento de este parámetro se observó para el décimo día y correspondió al grupo funcional P1. Estos resultados nos llevan a sugerir que los valores de pH no son significativos durante el evento que está ocurriendo en el medio acuoso, esto tiene que ver con el tipo de metabolito que se está produciendo por parte de la actividad bacteriana.

En la Figura 3 se puede observar la cinética de cambios en la conductividad del agua en el medio acuoso durante los 30 días de ensayo éstos son un indicador del proceso de mineralización de los compuestos orgánicos presentes en el medio. Aquí encontramos, que la cinética de comportamiento de los grupos funcionales es muy similar hasta los 20 días de exposición, de allí en adelante los grupos funcionales P3 y P4 tienden a incrementar notablemente la conductividad del agua en comparación con los otros dos grupos de bacterias. Este resultado parece señalar que no existen cambios en la liberación de electrolitos que incrementen la conductividad del agua, sin embargo, pareciera que existen diferencias en el comportamiento de los diferentes grupos funcionales en particular.

Los cambios en la Tensión Superficial son indicadores de la capacidad tensoactiva de ciertos metabolitos liberados por las bacterias, esta característica hace que estos organismos puedan ser potencialmente utilizables para ser usados en remoción de crudos en fosas de desecho o bien para emulsionar aceites permitiendo su desimpregnación en suelos afectados por derrames de aceites de diferente origen. En la gráfica 4 se observa

la cinética de cambios en la tensión superficial durante la biodegradación de PCB's, encontrando que sólo los grupos P1 y P2 son capaces de disminuir la tensión superficial del medio acuoso a los 10 días de exposición en mayor proporción que los otros dos gremios bacterianos restantes. Sin embargo, al final del ensayo los valores obtenidos para la tensión superficial del medio acuoso, en todos los casos estudiados es muy similar.

La tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl se hace necesaria para conocer la capacidad que poseen ciertos grupos de bacterias para degradar compuestos orgánicos recalcitrantes del tipo PAH (Hidrocarburos Poli aromáticos), en este sentido, se determinó la cinética de crecimiento de los cuatro grupos funcionales estudiados bajo cuatro diferentes concentraciones de NaCl (1, 5, 10 y 50 partes por mil). Los resultados se reportan en la Figura 5, allí se puede observar que durante los 30 días de exposición no hay cambios significativos para los cuatro grupos funcionales estudiados, esto sugiere que la capacidad de tolerancia a diferentes concentraciones de salmuera es muy amplia en todos los casos estudiados lo cual permite inferir que estos grupos de bacterias parecen estar adaptados a soportar concentraciones de NaCl dentro de un amplio rango, lo cual es muy posible se deba a la liberación de iones Cl<sup>-</sup> durante la biodegradación de los PCB's.

Es conocido que uno de los pasos iniciales para la biodegradación de compuestos orgánicos policlорinados es la ruptura de los enlaces clorados, esta respuesta se puede medir tomando en cuenta la concentración de iones cloruro disueltos en el medio acuoso.

En la Figura 6 se observan los cambios en la concentración de cloruro disuelto en el medio acuoso durante la degradación de PCB's por cada uno de los grupos funcionales estudiados. Allí encontramos que los grupos funcionales P2 y P4 prácticamente no tienen actividad mineralizadora de cloro, mientras que el gremio P1 es el que presenta una mayor eficiencia en este evento, reportando un incremento sostenido hasta los 30 días de duración del experimento, donde alcanza un valor de 18.8 ppm de ión cloro disuelto en el medio acuoso. El grupo Funcional P3 también tiene un comportamiento

similar, pero más lento, logrando obtener solo una concentración de 16.2 ppm al final del experimento.

Tomando en cuenta que, de los cuatro grupos bacterianos asociados al PCB's, el gremio P1 es aquel que posee la mayor capacidad de liberación de iones cloro en el medio, se realizó un experimento con el objeto de conocer la cinética de crecimiento del grupo funcional P1 crecido frente a diferentes concentraciones de PCB's (10 ppm, 15 ppm y 30 ppm). En la gráfica 7 se observa la cinética de crecimiento del pool P1, así como la liberación de iones Cl<sup>-</sup>, allí encontramos que el mayor crecimiento fue observado cuando el grupo funcional fue cultivado a una concentración de 10 ppm a partir de los diez días de exposición, mientras que la menor cinética de crecimiento se registró para la mayor concentración de PCB's. Este resultado coincide con la liberación de iones cloruro al medio, donde se alcanza un total de 20.3 ppm a los 30 días de ensayo para el grupo funcional cultivado en 15 ppm de PCB's. Estos resultados indican que el grupo funcional P1 asociado a suelos contaminados con PCB's, es capaz de tolerar diferentes concentraciones de PCB's, sin embargo cuando se usaron concentraciones en un rango de 10-30 ppm de este producto, su óptimo crecimiento, al igual que la actividad biodegradadora del químico es óptima a una concentración de 15 ppm., mientras que la menor capacidad para biodegradar es observada a concentraciones de 30 ppm de PCB's, estos cambios de

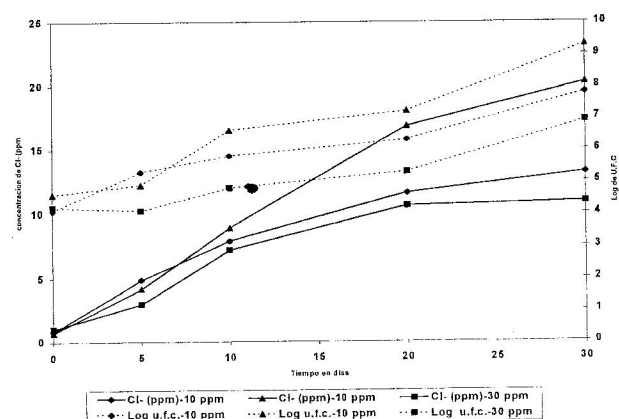


Figura 7. Cinética de crecimiento bacteriano y liberación de ión cloruro durante la degradación de diferentes concentraciones de PCBs.



concentración parecieran ejercer cierta presión sobre las bacterias inhibiendo sensiblemente su actividad como biodegradadoras de bifenilos policlorinados.

Luego de observar el comportamiento de estos grupos funcionales asociados a suelos contaminados con bifenilos, así como los cambios físico-químicos producidos al someter a degradación una mezcla de PCB's, se realizaron ensayos con el objeto de conocer el comportamiento de estos gremios sobre determinadas concentraciones del contaminante. Esto se realizó mediante la observación de la cinética limpieza de suelos contaminados con sustancias tóxicas recalcitrantes del tipo PCB's, se hace necesario conocer las comunidades de microorganismos presentes en estos suelos, ya que son ellas las que han ido soportando a través del tiempo las diferentes presiones causadas por la presencia de estos compuestos químicos en el suelo, los cuales de una u otra forma alteran los procesos que en condiciones normales están ocurriendo en el suelo, tales como: dinámica de crecimiento poblacional de la biota del suelo debido a su alta toxicidad, ciclaje de nutrientes afectando la disponibilidad de éstos, alteración de la capacidad de retención del agua (CRA) en el suelo, debido a su condición de compuestos aceitosos, además de restringir el intercambio gaseoso disminuyendo la disponibilidad de oxígeno, etc.

Estos efectos, además de su conocido nivel de toxicidad y daños potenciales que causa a la biota del suelo, organismos silvestres y al hombre, hacen necesario un estudio detallado de aquellos microorganismos capaces de degradar este tipo de compuestos, como una forma de manejarlos de una forma adecuada y a través de procesos biotecnológicos, se puedan realizar a escala piloto manejos que permitan su eliminación y el saneamiento de suelos contaminados con PCB's. De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos señalar que los bifenilos policlorinados debido a sus características estructurales, son compuestos orgánicos de alta toxicidad para los organismos vivos, causando daños en los órganos reproductivos, sistemas neurológicos e inmunes de animales y humanos donde generalmente producen cáncer de la piel. Esto conduce a señalar el gran potencial de riesgo a la salud y al ambiente que estos compuestos poseen además de su gran resistencia a la biodegradación.

Tomando en cuenta estas circunstancias, se hace necesario buscar alternativas que permitan su degradación, más aún teniendo en cuenta que ellos

son solubles en ácidos grasos por lo que presentan la tendencia a acumularse en los organismos a través de la cadena alimenticia. La literatura ha reportado niveles de contaminación por PCB's en tejidos grasos de algunos animales vertebrados, incluyendo humanos (Alloway y Ayres, 1993; Jacobson y Jacobson, 1997; McKinney y Waller, 1994.)

En estudios en glándulas mamarias de delfines, se han encontrado niveles por encima de 195 ppm. y más de 232 ppm. en la leche de focas del ártico (Alloway y Ayres, 1993.). Los resultados obtenidos, sugieren que el principal efecto estrogénico de los PCB's puede ser debido a los metabolitos hidroxilados similares a los estrógenos, los cuales son producidos cuando el organismo pretende romperlos, adicionando moléculas de PCB's.

Estas particularidades de los bifenilos, así como otros compuestos clorinados del tipo de las dioxinas hace necesario la toma de medidas en el sentido de buscar compuestos orgánicos o sintéticos que puedan suplir el uso de estos productos como una forma de mitigar el daño ambiental y de salud que causan los bifenilos policlorinados.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

- \* El gremio bacteriano P1 fue el grupo funcional que presentó mayor capacidad para degradar PCB's.

- \* Existe una cerrada correlación entre la disminución de unidades de pH y el incremento de la conductividad del agua debido a la liberación de iones cloruro por actividad biodegradadora bacteriana.

- \* Los grupos funcionales de bacterias provenientes de suelos contaminados con PCB's son una alternativa muy efectiva para degradar compuestos orgánicos clorinados, disminuyendo el tiempo y costo de su obtención y manejo en comparación con la utilización de cepas autóctonas.

- \* La utilización de grupos funcionales bacterianos asociados a suelos contaminados con PCB's es la mejor vía para obtener microorganismos eficientes en biorremediación de suelos contaminados.

## AGRADECIMIENTOS

El autor quiere agradecer a la Ing. Rebeca Erebríe Gerente Ambiental de Edelca CVG por su colaboración en el suministro de muestras de suelos impregnados con PCB's y mezcla de PCB's.

La colaboración técnica prestada por los Bachilleres Julio Cordero y Anibal Hernández Pasantes del Laboratorio de Microbiología Ambiental durante la realización del presente trabajo. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el Proyecto 03-31-3553 - 97

## LITERATURA CITADA

ALLOWAY, B. J. AND DAYRES, D. C.

1993. *Chemicals principles of environmental pollution*. Blackie Academic & Professional, London.

BASTARDO, H., L. VIERMA AND A. ESTEVEZ

1993. Microbial characteristics and metabolic activity of bacteria from Venezuelan oil wells. In E. Premuzic and A. Woodhead (Eds). *Development in Petroleum Science 39. Microbial Enhancement of Oil Recovery*. Elsevier, London, pp 307-318.

CHAN, I. J. CHAN, R. TSANG AND T. CHUNG

1998. The environmental aspects of Polychlorinated Biphenyls ( PCB's). *Chemistry of PCB's*. Butterworth Publ., Woburn, MA.: 299-310.

JACOBSON, J. L. AND S. W. JACOBSON

1997. Evidence for PCB's as neurodevelopmental toxicants in humans. *Neurotoxicology*, 18: 415-424.

LINDEN, D. AND Z. SUN

1998. Biphenyl Pathway Map. Compound and Reactions (BBD Main Menu). University of Minnesota. <http://www.labmed.umn.edu/umbbd/bph/bph-map.html>

MCKINNEY, J. D. AND C. L. WALLER

1994. Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues. *Environ. Health Persp.* 102: 290-297.

PCB'S (ECO-PRSSQ.)

1988. *Manejo Seguro de los BPC*. Código de Prácticas. Editado por el Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OPS:OMS. Metepec, MEXICO, 39 pp.