

ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LOS ISÓMEROS α - Y β -HEXACLOROCICLOHEXANO POR *STREPTOMYCES* SP. M7

Study of the α - and β - hexachloreycyclohexane isomers degradation by *Streptomyces*

Sineli P., Fuentes S., Benimeli C., Álvarez A., Amoroso M., Cuzzo S.*PROIMI-CONICET.
Universidad Nacional de Tucumán. *Scuzzo@proimi.org.ar

RESUMEN

Se sabe que la producción del isómero γ del hexaclorociclohexano (γ -HCH), el cual posee propiedades insecticidas, involucra la formación de ocho isómeros sin propiedad insecticida, y que representan el 85-86% del total de la mezcla producida. De todos ellos, los isómeros más abundantes son: α -HCH (65-70%), β -HCH (7-10%), δ -HCH (7%), ϵ -HCH (1-2%) y en última instancia los isómeros η - y θ -HCH (< 2%). Siendo el isómero β -HCH el más recalcitrante de todos ellos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la degradación aeróbica de los isómeros α - y β - del HCH como única fuente de carbono por actinobacterias regionales. Para ello se determinaron los niveles de remoción de los isómeros del HCH por *Streptomyces* sp. M7 en medio mínimo (MM), mediante la determinación del contenido residual de los isómeros en los sobrenadantes, luego de 7 días de incubación. Las metodologías empleadas en los diferentes ensayos fueron: determinación de cloruros liberados, crecimiento por biomasa (peso seco) y de isómeros de HCH residual por cromatografía gaseosa con microcaptura de electrones. Se observó que *Streptomyces* sp. M7 removió un 100% de α -HCH y un 55% de β -HCH en las condiciones óptimas de cultivo: temperatura de 30 °C, pH 7 y una concentración máxima de 8,3 mg L⁻¹ del isómero correspondiente. Asimismo, *Streptomyces* sp. M7 mostró mayor crecimiento total en presencia de α -HCH que en presencia de β -HCH como única fuente de carbono, lo cual se asocia con la remoción total o parcial del isómero respectivamente.

Este es el primer trabajo en el cual se describe una actinobacteria capaz de degradar el isómero β -HCH en condiciones aeróbicas.

SUMMARY

Known it that production of γ hexachlorocyclohexano (γ -HCH), which has insecticidal properties, the formation of eight isomers with not insecticidal property, representing between 85-86 % of the mixture produced. Of these, the most abundant isomers are: α -HCH (65-70%), β -HCH (7-10%), δ -HCH (7%), ϵ - HCH (1-2%) and the last instance the isomers η - y θ -HCH (< 2%). Being β -HCH isomers the most recalcitrant of all them.

The aim of this work was to study the isomers aerobic degradation by α - and β - HCH as a carbon source by regional actinobacterias. For this we identified HCH isomers removal levels by *Streptomyces* sp. M7 in minimal medium (MM), by determining the isomers residual content in the supernatants after 7 incubation days. The methodologies employed in the different test were: ion chloride liberated determination, biomass growth (dry weight) and HCH isomers residual by gas chromatography with electron microcapture.

It was observed that *Streptomyces* sp. M7 removed to 100% of α -HCH and 55% of β -HCH in the optimal culture conditions: 30 °C, pH 7 and the isomers maxima concentration of 8.3 mg L⁻¹. Also, *Streptomyces* sp. M7 showed greater overall growth in the presence of α -HCH than β -HCH that the only carbon source, which is associated with total or partial removal of the isomers respectively.

This is the first work which describes a actinobacteria capable of isomer β - degrading under aerobic conditions.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organoclorados (POs) son un grupo de compuestos orgánicos de síntesis, derivados de hidrocarburos, en los que uno o más átomos de hidrógeno son sustituidos por átomos de cloro. Constituyen un grupo muy heterogéneo de sustancias, cuya estructura química corresponde en general a la de hidrocarburos clorados, aunque algunos de ellos contienen otros elementos tales como oxígeno y azufre (Arias Verdes y col., 1988).

Los plaguicidas organoclorados se introdujeron al mercado en las décadas de 1940 y 1950. Inicialmente tenían importantes roles en el control de plagas y de enfermedades transmitidas por vectores (WHO, 1990). Sin embargo, en la década del 60 comenzó a acumularse evidencia acerca de sus efectos indeseables (Vega y col., 2007).

Hoy, dichos plaguicidas despiertan preocupación mundial y su aplicación se ha eliminado debido a su toxicidad, gran persistencia, baja biodegradabilidad, amplia distribución en el medio ambiente y sus efectos crónicos sobre la vida silvestre y los seres humanos (Quintero y col., 2005; Malik y col., 2009).

Los residuos de POs en suelos, agua, alimentos, aire o seres vivos, aún en pequeñas concentraciones, constituyen una forma de contaminación del ambiente. Las causas pueden ser directas e indirectas. Las primeras son: el uso agropecuario y sanitario de dichos plaguicidas, ya que una parte de estos persiste en el medio después de ejercer su acción biológica contra el objetivo que se desea controlar. Las indirectas abarcan el arrastre, que depende de varios factores como ser el clima, la formulación del producto y la forma de aplicación. En general, el fenómeno de contaminación ambiental por los POs es un fenómeno cambiante, dinámico y no siempre controlable (Fuentes, 2006).

Actualmente está bien establecido que estos compuestos, con su elevada liposolubilidad, tienen efectos adversos sobre los organismos, ya que se acumulan principalmente en los tejidos adiposos de aquellos sometidos a exposiciones repetidas o crónicas y pasan mediante la cadena alimenticia a animales superiores, incluyendo

seres humanos, ocasionando una variedad de efectos patológicos agudos y crónicos (Cid y col., 2007; Vega y col., 2007). También pueden ingresar en la cadena alimenticia a través del agua y los vegetales consumidos por los herbívoros, incluyendo el ganado vacuno (WHO, 1990).

Su acumulación, incluso en bajas concentraciones, en la grasa corporal de los mamíferos y su lenta velocidad de degradación podrían causar posibles riesgos a largo plazo (Metcalf, 1997). Se sabe que dichos plaguicidas causan efectos tóxicos en los sistemas reproductivo y nervioso y que pueden afectar la función normal del sistema endócrino (Yamaguchi y col., 2003). También han sido vinculados a cánceres de hígado y de mama, tumores testiculares y bajo recuento de espermatozoides en hombres (Malik y col., 2009).

Los plaguicidas organoclorados no solo se acumulan en los tejidos de animales, sino que muchos de ellos persisten en suelos y plantas y, si son lo suficientemente solubles, también pueden llegar a las aguas subterráneas o superficiales, lo cual representa un riesgo muy alto para la salud, ya que estas aguas son fuentes de suministro de agua potable (Ritter, 1990).

El uso intensivo de los plaguicidas organoclorados se incrementó a partir del final de la Segunda Guerra Mundial; y entre ellos, uno de los más utilizados fue el lindano (Zuloaga y col., 2000).

Durante el proceso de síntesis del lindano también se generan isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), y los más importantes son los designados β , γ , δ , θ , ϵ , η y dos α -enantiómeros, los cuales difieren solamente en la orientación de los átomos de cloro unidos a los diferentes átomos de carbono. Donde el más recalcitrante de los isómeros es el β -HCH. En el mercado internacional existen dos formulaciones comerciales del HCH: lindano de grado puro (99% de γ -HCH) y lindano de grado técnico, este último es una mezcla de isómeros en la cual el γ -HCH es el ingrediente activo, debido a que es el compuesto con actividad insecticida más potente (Okeke y col., 2002).

El lindano se utilizó ampliamente en todo el mundo. Debido a su bajo costo, elevada eficiencia y disponibilidad inmediata fueron algunas de las razones de su uso excesivo, principalmente en los países en vías de desarrollo (Bhatt y col., 2007). Este se empleó en el pasado con diversos fines, entre ellos la agricultura para el control de plagas, veterinaria, fumigaciones de casas y áreas de almacenamiento comercial, control de parásitos en animales, control de mosquitos, hormigas, larvas, langostas, etc. (Phillips y col., 2005). También se usó en salud humana, para el tratamiento de la escabiosis y la pediculosis, en forma de lociones, cremas y shampoos, ya que es un insecticida de amplio espectro y sirve para eliminar tanto a los insectos fitófagos como a los parásitos de animales y del hombre (Johri y col., 1996; Bidlan y col., 2004).

Por otra parte la biorremediación es el uso de organismos vivos o parte de estos, para degradar, remover y/o transformar contaminantes ambientales. Los principales organismos utilizados son bacterias, hongos, levaduras, algas y plantas de existencia natural o genéticamente modificados. (Boopathy, 2000; Vidali, 2001; Robles-González y col., 2008). Las técnicas de biorremediación permiten la transformación de contaminantes con un menor consumo de químicos, energía y tiempo, es una alternativa eco-amigable (Haritash y Kaushik., 2009).

Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas para la degradación aeróbica de los isómeros α y β del HCH. Este es el primer trabajo en donde se determinó que las actinobacterias son capaces de actuar sobre los isómeros del lindano en condiciones aeróbicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa utilizada fue *Streptomyces sp.* M7, fue aislada previamente en el laboratorio a partir de sedimentos de un canal de drenaje de una planta de filtros para la obtención de cobre localizada en una zona agrícola de Tucumán, Argentina, el microorganismo se seleccionó debido a su capacidad de crecer en presencia de lindano como única fuente de carbono (Benimeli, 2004).

Para la preparación del inóculo la cepa se sembró en forma de césped en cajas de petri con

medio caseína almidón agar que contiene: (en g L⁻¹) almidón, 10; caseína, 1; K₂HPO₄, 0,5; agar, 15 a pH 7,0 (Hopwood, 1985) e incubadas a 30°C durante 7 días, dichas placas obtenidas se las cosecha para obtener una suspensión de esporos, a la cual se la acondicionó a una concentración de 10⁹ UFC mL⁻¹ necesarias para realizar los ensayos propuestos.

Las diferentes condiciones de crecimiento analizadas se realizaron en medio mínimo (MM) que contiene en (g L⁻¹): L-asparagina, 0,5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄·7H₂O, 0,20; FeSO₄·7H₂O, 0,01, (Kieser y col., 2000), se reemplazo L-asparagina por (NH₄)₂SO₄, 4,0 g por l. debido a que los ensayos utilizo a los isómeros α y β del HCH como única fuente de carbono.

Para determinar el pH inicial óptimo de crecimiento y de degradación de los isómeros (α -HCH y β -HCH) se analizaron a pH iniciales de 7 y 9, donde se utilizo HCl 1N o NaOH 1N para ajustar el pH del medio mínimo. De igual manera para estudiar el efecto de la concentración óptima de los isómeros sobre el crecimiento del microorganismo y la remoción, se analizaron dos concentraciones 1,66 mg L⁻¹ y 8,33 mg L⁻¹.

Se inocularon la suspensión de esporos en frascos con 30mL de MM seleccionado para cada ensayo y se los incubaron a 30°C con una agitación de 100 RPM, los ensayos se realizaron por triplicado, donde se tomaron muestras a distintos tiempos 0, 1, 4 y 7 días para realizar las diferentes determinaciones del presente trabajo.

Determinación del crecimiento microbiano

En los diferentes ensayos se determinaron peso seco como medida de crecimiento, la técnica consistente en: centrifugación a 8.500 rpm durante 10 minutos, a fin de separar las células. Éstas se lavaron con agua destilada estéril y se dispusieron en cápsulas de papel de aluminio, previamente taradas. Luego se secaron a 85 °C hasta peso constante y se determinó el peso seco por diferencia de pesadas, utilizando la siguiente fórmula: PS (mg mL⁻¹) = (P2 – P1).1000/30 donde: PS: Peso seco (mg mL⁻¹); P1: Peso de la cápsula vacía (g); P2: Peso de la cápsula después de secar hasta peso constante (g).

Determinación de iones cloruros

La liberación de iones cloruros al medio de cultivo se determinó mediante un método óptico donde se mide la turbidez que se genera cuando el ión cloruro precipita como AgCl (Iwasaki y col., 1952). El método consistió que a 0,5 mL de sobrenadante se le agregó 0,5 mL HNO₃ 0,15N mas 0,5 mL AgNO₃ 0,1N, se dejó reposar por 15 minutos y se realizó las lecturas de absorbancia a 600 nm de longitud de onda. Para la interpretación de los resultados se consideró que a mayor valor de absorbancia mayor concentración de iones cloruros liberados, por lo tanto esto significó una mayor degradación de los isómeros.

Determinación de α y β Hexaclorociclohexano residual

A partir de los sobrenadantes de los cultivos se determinó los isómeros de HCH residual por Cromatografía Gaseosa, previa recuperación y concentración de los isómeros residuales por medio de una extracción en fase sólida.

Las muestras así obtenidas, se analizaron en un Cromatógrafo de Gases (Agilent 7890A), equipado con una columna capilar HP-5 (5%-fenil metilpolisiloxano; 30m, 0,32 mm, 0,25 μ m), con detector de microcaptura de electrones (μ ECD), inyector split/splitless y software Chemstation para manejo, operación, recolección y análisis de datos.

La inyección de los extractos obtenidos se realizó con un inyector automático (Agilent 7683B), en modo splitless, con temperatura del detector de 300 °C y del inyector de 250 °C. En el horno se llevó a cabo el siguiente programa de temperaturas: partir de 180 °C hasta alcanzar una temperatura de 250 °C, a una velocidad de calentamiento de 40 °C min⁻¹. Luego se calentó hasta 280 °C a una velocidad de 10 °C min⁻¹. Se

usó nitrógeno como gas transportador y como gas auxiliar (60 mL min⁻¹).

La cuantificación de los plaguicidas organoclorados se hizo utilizando una curva de calibración realizada con diferentes diluciones de una solución patrón para cromatografía gaseosa (AccuStandard). El límite de detección del método fue de 0,01 μ g L⁻¹.

RESULTADOS

Efecto del pH y concentraciones de los isómeros del HCH sobre el crecimiento microbiano

En el estudio de crecimiento de *Streptomyces sp.* M7 crecida con el isómero β -HCH como única fuente de carbono, se observó un máximo crecimiento (0,41 mg mL⁻¹) a las 24 Hs de incubación a un pH inicial de 9, superando el crecimiento en una vez en comparación al determinado en las mismas condiciones pero a un pH inicial de 7, indicándonos que ese fue el pH óptimo de crecimiento para nuestro microorganismo en estudio. Por otro lado, cuando se utilizó el isómero α -HCH como única fuente de carbono, se registró un peso seco de 0,31mg mL⁻¹ a un inicial de pH 7 al cuarto día de incubación, igual valor fue obtenido a pH 9, pero a diferencia del anterior este fue al séptimo día de incubación, lo que nos indicó que el mejor crecimiento fue a un pH neutro (Figura 1 a).

Estudiando el efecto de la concentración inicial de los isómeros se pudo observar que, a una concentración inicial de 8,33 mg L⁻¹ se observó un crecimiento de 0,28 mg mL⁻¹ para el isómero α -HCH y 0,29 mg mL⁻¹ para β -HCH a pH 7, superando 5 veces en ambos casos el valor observado a pH 9, lo cual nos indicó que no hubo un efecto inhibitorio por el aumento de la concentración de los isómeros del HCH analizados (Figura 1 b).

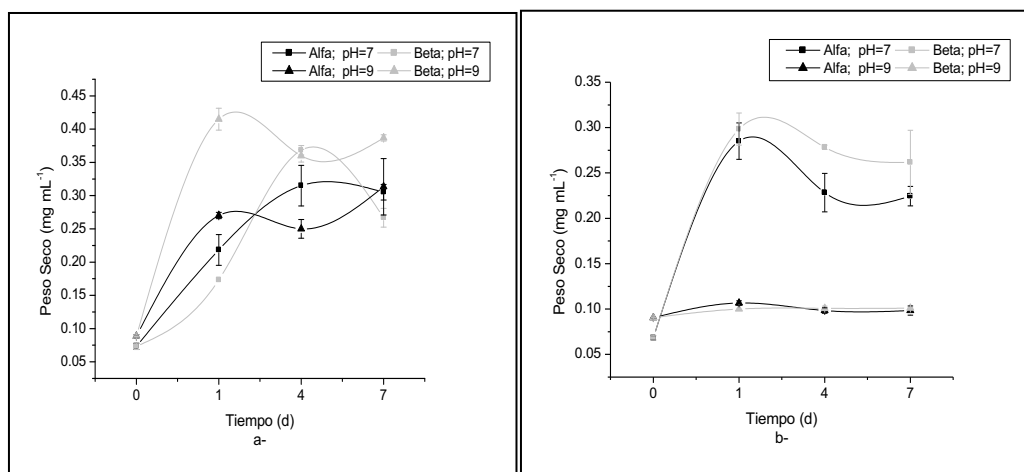


Figura 1: Determinación de crecimiento microbiano por medio de Peso Seco a dos concentraciones iniciales de los isómeros α -HCH y β -HCH: a- 1,66 y b- 8,33 mg L⁻¹.

Determinación de los iones cloruros liberados a diferentes pH y concentraciones de los isómeros

Se estudió la liberación de cloruros a una concentración inicial de 1,66 mg mL⁻¹ del isómero α -HCH, y se observó una mayor liberación de los iones a un pH 7 al séptimo día de incubación (0,0238 Abs), superando en 3 veces en comparación a los cloruros liberados a pH 9; mientras que para el isómero β -HCH a pH 7 se observó una mayor liberación de los iones cloruros, con un valor de Absorbancia de 0,025,

es decir 5 veces mayor en comparación al observado a pH 9. (Figura 2 a).

Cuando se realizaron los mismos ensayos a una mayor concentración inicial de los isómeros de HCH (8,33 mg mL⁻¹), se observó una liberación de cloruros claramente favorecida a un pH 7, cuyo valor superó en 15 veces al valor obtenido a un pH alcalino de 9 para el ensayo realizado con el isómero α -HCH, y 3 veces para el isómero β -HCH, valores determinados al séptimo día de incubación. (Figura 2 b).

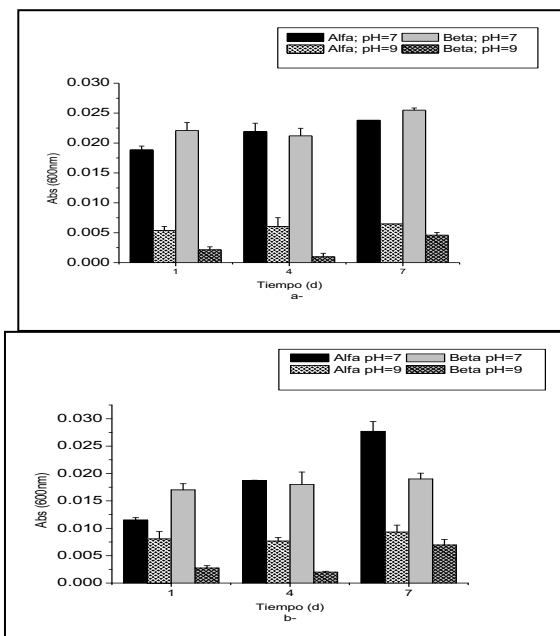


Figura 2: Determinación de iones cloruros liberados por medio de turbidimetría a dos concentraciones iniciales de los isómeros α -HCH y β -HCH: a- 1,66 y b- 8,33 mg L⁻¹.

Determinación de α y β -Hexaclorociclohexano residuales

Otro estudio complementario realizado fue la determinación de los isómeros residuales presentes en los sobrenadantes, por lo que se observó que a una concentración inicial de 1,66 mg L⁻¹ del isómero α -HCH una remoción del 78,51%, mientras que el isómero β -HCH fue del 65,30%. Mientras que a una concentración

de 8,33 mg L⁻¹ se observó que el isómero α -HCH presentó el máximo porcentaje de remoción llegando a un valor de 84,62% superando en ocho veces el valor obtenido por el isómero β -HCH a la misma concentración inicial. Por lo que a las concentraciones estudiadas no se observó un efecto inhibitorio marcado

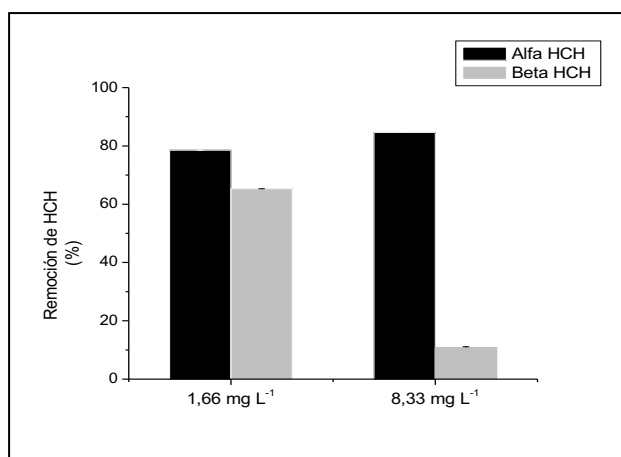


Figura 3: Porcentajes de remoción de los isómeros en los sobrenadantes de cultivos a pH 7 al séptimo día de incubación.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demostró que *Streptomyces* sp. M7 posee la capacidad de utilizar a α y β Hexaclorociclohexano como única fuente de carbono, crecido en medio mínimo. Se demostró que las condiciones óptimas para su crecimiento fueron de un pH 7 y una concentración inicial de los isómeros α -HCH y β -HCH de 1,66 mg L⁻¹, como única fuente de carbono, sin embargo a un pH 9 y a una concentración inicial de 1,66 mg L⁻¹ de isómero β -HCH, el microorganismo mostró el máximo crecimiento.

En cuanto a la remoción de los isómeros α -HCH y β -HCH, se demostró que, a las condiciones analizadas, un pH inicial de 7 es el óptimo para ambos isómeros, ya que se obtuvo valores de liberación de cloruros ampliamente mayores que a las observada a pH 9 en 1,66 mg L⁻¹ y a 8,33 mg L⁻¹ de α -HCH y β -HCH. Mientras que para α -HCH tanto a 1,66 y 8,33 mg L⁻¹ se obtuvo porcentajes de remoción que

superan un 75%, sin embargo a una concentración de 8,33 mg L⁻¹ se obtuvo el máximo porcentaje de remoción de 85%, demostrando que la remoción de α -HCH no es inhibida por un aumento de concentración del isómero.

Estos resultados parciales darán lugar a seguir estudiando distintas condiciones óptimas de remoción de los isómeros del hexaclorociclohexano por parte de *Streptomyces* sp. M7, para ser empleada como agente biorremediador de ambientes contaminados con Hexaclorociclohexano.

BIBLIOGRAFIA

- Arias Verdes J.A.; Riera Betancourt C.; Rojas Companioni D.; Cabrera Cruz N.; Dierckmeier Corcuera G. (1992). Plaguicidas Organoclorados. Centro de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia. Organización

Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.

- Bhatt P.; Kumar M.S.; Chakrabarti T. (2007). Assesment of bioremediation possibilities of technical grade hexacholocyclohexane (tech-HCH) contaminated soils. *J. of Hazardous Materials*. 143: 349-353.
- Benimeli, C.S., Amoroso, M.J., Chaile, A.P., Castro, R.G., 2003. *Bioresource Technology* 89, 348-357.
- Bidlan R.; Afsar M.; Manonmani H.K. (2004). Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*. 56: 803-811.
- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67
- Cid F.D.; Antón R.S.; Caviedes-Vidal E. (2007). Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina. *Science of the Total Environment*. 385: 86-96.
- Cuozzo S.A., Abate, C.M., Rollan, G. C and Amoroso M.J. (2009) *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25: 1539-1546.
- Fuentes, M.S., Benimeli, C.S., Cuozzo, S.A., Amoroso, M.J., 2010. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64, 434-441.
- Fuentes M.S. (2006). Inhibición por *Streptomyces* sp. M7 de efectos tóxicos de lindano sobre plantas de maíz. Tesis de grado. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.
- Haritash A.K. & Kaushik C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*
- Iwasaki LS, Utsumi S and Ozawa T (1952). *Bull. Chem. Jpn.* 25: 226-230. Kieser, T., Bibb, MJ, Buttner MJ, Chater K. & Hopwood, DA (2000). Norwich: The John Innes Foundation. England.
- R. Calvelo Pereira, M. Camps-Arbestain I, B. Rodriguez Garrido, F. Macías, C. Monterroso (2006). *Environmental Pollution* 144: 210-217.
- FAO/WHO. (1990-1995). Pesticides residues in food, Evaluations. Part I- Residues.
- Quintero J.C.; Moreira M.T.; Gumersindo F.; Lema J.M. (2005). Anaerobic

degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere*. 61: 528-536.

- Robles-Gonzalez Fava F. & Poggi-Valardo H. (2008). A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories* 7:5
- Malik A.; Ojha P.; Singh K.P. (2009). Levels and distribution of persistent organochlorine pesticide residues in water and sediments of Gomti River (India) - a tributary of the Ganges River. *Environ Monit Assess.* 148: 421-435.
- Metcalf R.L. (1997). Pesticides in aquatic environment. (M. A. Q. Khan Ed.) *Pesticides in Environment* (p. 127). New York: Plenum.
- Okeke B.C.; Siddique T.; Arbertain M.C.; Frankenberger W.T. (2002). Biodegradation of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane) and alpha-hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Pandora* species. *J Agric Food Chem.* 50: 2548-2555.
- Phillips T.M.; Seech A.G.; Lee H. and Trevors J.T. (2005). Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*. 16: 363-392.
- Johri A.K.; Dua M.; Tuteja D.; Saxena R.; Saxena D.M.; Lal R. (1996). Genetic manipulations of microorganisms for the degradation of hexachlorocyclohexane. *FEMS Microbiol. Reviews* 19: 69-84.
- Ritter W.F. (1990). Pesticide contamination of groundwater in the United States-A review. *J. Environ. Sci. Health.* 25: 1-29.
- Vega F.A.; Covelo E.F.; Andrade M.L. (2007). Accidental organochlorine pesticide contamination of soil in Porriño, Spain. *J. Environ. Qual.* 36: 272-279.
- Vidali M. (2001). Bioremediation. An overview. *IUPAC, Pure and Applied Chemistry* 73:1163-1172.
- WHO. (1990). Public health impact of pesticides used in agriculture. WHO and UNEP, Geneva.
- Yamaguchi N.; Gazzard D.; Scholey G.; Macdonald D.W. (2003). Concentrations and hazard assessment of PBC, organochlorine pesticide and mercury in fish species from the upper Thames: River pollution and its potential effects on top predators. *Chemosphere*. 50: 265-273.

Zuloaga O.; Etxebarria N.; Fernandez L.A.; Madariaga J.M. (2000). Optimization and comparison of MAE, ASE and Soxhlet extraction for the determination of HCH isomers in soil samples. Fresenius J Anal Chem. 367