


Evaluación mediante espectrofotometría UV-VIS derivativa de la degradación del 2-clorofenol

Evaluation by Means of Derivative UV-VIS Spectrophotometry of the Degradation 2-Chlorophenol

MSc. Irasema Pérez-Portuondo, Lic. Isabel Aguilera-Rodríguez, Dra. Magaly Casals-Hung,
Dra. Arelis Ábalos-Rodríguez, Dra. Rosa M. Pérez-Silva
ira@cebi.uo.edu.cu; isabel@cebi.uo.edu.cu; magalycasals@cnt.uo.edu.cu; 
rmaria@cebi.uo.edu.cu; aabalos@cebi.uo.edu.cu

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

● Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo utilizar la espectrofotometría derivativa en la región UV-Visible para estudiar la degradación del 2-clorofenol (2-CF), el cual es notoriamente persistente y tóxico para la mayoría de los sistemas biológicos en concentraciones superiores a los 300 mg/L. Se aislaron dos cultivos bacterianos de suelos contaminados con hidrocarburos denominados RS 11 y RS 13 y se evaluó la degradación del 2-clorofenol utilizando dichos cultivos y después de la adaptación. La degradación ensayada no solo demostró que ocurría la degradación sino que era necesaria la adaptación de los microorganismos al compuesto orgánico para mejorar la velocidad de degradación del compuesto por los aislados ensayados.

Palabras clave: biodegradación, espectrofotometría UV derivativa, 2-clorofenol.

● Abstract

This work aims to perform the using of derivative spectrophotometry to study the degradation of the 2-chlorophenol (2-CF), which is notoriously persistent and toxic for most of the biological systems to concentrations but high that 300 mg/L. In this study two microbial culture, RS 11 and RS 13, were isolated from polluted soils and the ability of the isolates to remove phenol was tested by scanning the first derivated spectra with a UV-VIS spectrophotometer. The results indicated that the isolates metabolized phenol and it was necessary the adaptation of the microorganisms to the organic compound to improve the speed of degradation of the compound for the isolated.

Key words: biodegradation, derivative UV spectrophotometry, 2-chlorophenol.

● Introducción

La presencia de compuestos aromáticos monoclorados en el medio ambiente se debe al uso extensivo de los mismos tanto en la agricultura como en la industria. Entre los compuestos fenólicos clorados contaminantes se encuentra el 2-clorofenol (2-CF), el cual es notoriamente persistente y tóxico para la mayoría de los sistemas biológicos en concentraciones superiores a los 300 mg/L /1/. Para la degradación de los compuestos fenólicos clorados

son preferibles los métodos biológicos por resultar más económicos y presentar escasa probabilidad de formación de derivados indeseados; de ahí la necesidad de búsqueda de bacterias que degraden completamente concentraciones cercanas a estas y sus ensayos a concentraciones entre los 100 y 300 mg/L. En general, los fenoles clorados son transformados mediante la dechlorinación oxidativa (biodegradación aeróbica) y generalmente se utilizan para la caracterización de los clorofenoles: la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector

UV-VIS, la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, el método colorimétrico utilizando la 4-aminoantipirina y el espectrofotométrico UV-VIS /2-11/.

Este trabajo tiene como objetivo utilizar la espectrofotometría derivativa en la región UV-Visible para estudiar la degradación del 2-clorofenol (2-CF).

La espectroscopia electrónica UV-VIS presenta una serie de características que favorecen su uso en análisis químicos rutinarios entre las cuales podemos mencionar: simplicidad operacional, elevada velocidad analítica, bajo costo y posibilidades de uso en sistemas de control on-line. Sin embargo, los problemas de interferencia espectral que generalmente se observan en este tipo de espectroscopia limitan sus aplicaciones.

Como estrategia para mitigar la baja selectividad del método espectrofotométrico en la región UV-VIS se utiliza en la actualidad el método derivativo, el cual en los últimos años ha ido ganando en aplicaciones como poderosa herramienta para análisis químicos cuantitativos y la caracterización y control de calidad de diversos procesos industriales /12-16/.

La espectrofotometría UV-VIS derivativa consiste en la representación de la variación de la absorbancia respecto a la longitud de onda en función de la longitud de onda. Esta técnica ofrece varias ventajas respecto a los métodos convencionales ya que distingue características espectrales que sobresalen de las bandas registradas en el espectro aumentando la resolución en solapamientos de espectros /17/.

● Materiales y métodos

Aislamiento

Se aislaron dos cultivos bacterianos de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos a una refinería denominados RS 11 y RS 13.

Degradación del 2-clorofenol

Para conocer la capacidad de las bacterias para degradar el 2-CF se tomaron los aislados bacterianos conservados en agar nutriente, para lo cual, previamente las bacterias fueron cultivadas en caldo nutriente durante 24 h. Posteriormente se lavaron dos veces con medio mineral salino (MMS) y luego los

botones celulares obtenidos se resuspendieron en un volumen final de un mililitro de este medio.

Se tomaron alícuotas de 0,5 mL de los inóculos iniciales (D.O = 1,0) y se añadieron en el medio MMS suplementado con 200 mg/L de 2-clorofenol. Se incubó manteniéndose en agitación a 146 rpm (zaranda KS 125 basic IKA LABORTECHNIK, GERMANY) durante once días, realizando toma de muestras cada cuatro días.

Se realizó la aclimatación de los aislados bacterianos conservados en el medio MMS con 1,5 % de agar y 2-CF 500 mg/L. Para realizar la misma los cultivos bacterianos se inocularon en el medio MMS + glucosa 1 %, con 2-CF 200 mg/L. Se añadió igual concentración de 2-CF cada nueve días, en cuatro ocasiones durante dos meses, incubando en agitación hasta que el cultivo estuvo turbio, indicativo de crecimiento celular.

Posterior al proceso de aclimatación se tomó un inóculo de 0,1 mL de los cultivos y se añadieron en medio MMS con 300 mg/L de 2-CF como única fuente de carbono para evaluar el proceso de degradación. Se realizaron dos réplicas de cada aislado y se muestreó cada cuatro días. En ambas variantes se empleó un control sin inocular para evaluar la degradación abiótica.

Remoción del 2-CF

La remoción del 2-CF fue monitoreada con un espectrofotómetro Spectroquant® Pharo 300 Merck a través de la lectura del espectro UV. Los espectros fueron obtenidos en las muestras libres de células y los controles colectados a diferentes tiempos de incubación, leyéndose en el intervalo de longitudes de onda de 200-450 nm. Se obtuvieron los espectros de la primera derivada para evaluar la existencia de intermediarios.

Previamente se seleccionó la longitud de onda de trabajo realizando un barrido espectral entre 200 y 700 nm. A la longitud de onda donde se encontró el máximo de absorción se realizó la lectura de la curva de calibración graficando DO (densidad óptica) vs C (concentración en mg/L). La curva de calibración se realizó con los

estándares en el rango de 3-150 mg/L de 2-CF (ver figura 1). El porcentaje de degradación se calculó según la fórmula:

$$\% \text{Degradación} = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100 \quad (1)$$

Todas las lecturas se realizaron contra blanco de medio MMS sin el compuesto aromático /18/.

Análisis estadístico

Los resultados de la degradación de 2-CF en el tiempo, en todos los experimentos, se evaluaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple, un test de Duncan para la comparación de medias y rectas de regresión para constatar la existencia de diferencias significativas con los controles.

● Resultados y discusión

Evaluación de la degradación del 2-clorofenol por aislados bacterianos sin adaptar.

Los aislados conservados en medio agar nutriente, se utilizaron para conocer la capacidad que tienen estas bacterias sin adaptación para degradar el compuesto orgánico estudiado. Para esto, los aislados seleccionados fueron inoculados en MMS suplementado con 200 mg/L de 2-CF, buscándose en el mismo el cambio de coloración del medio indicativo de la acumulación de algún intermediario. Para evaluar la concentración del 2-CF se utilizó la curva de calibración representada en la figura 1 obtenida a la longitud de onda máxima del espectro UV del 2-CP igual a 274 nm.

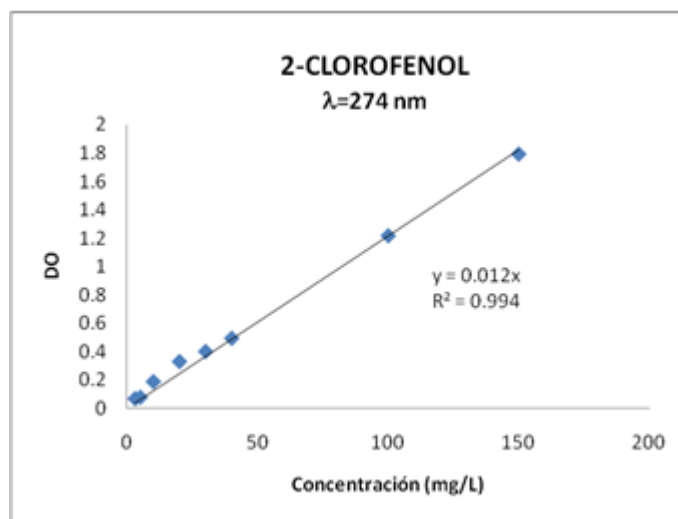


Fig. 1 Curva de calibración del 2-clorofenol con máximo de absorción a 274 nm mediante espectrofotometría UV/VIS.

Al evaluar los espectros obtenidos de los aislados se encontró una disminución de la intensidad de la banda de absorción con longitud de onda máxima a 274 nm, donde absorbe el 2-CF, a medida que transcurrió el tiempo (figuras 2 y 3).

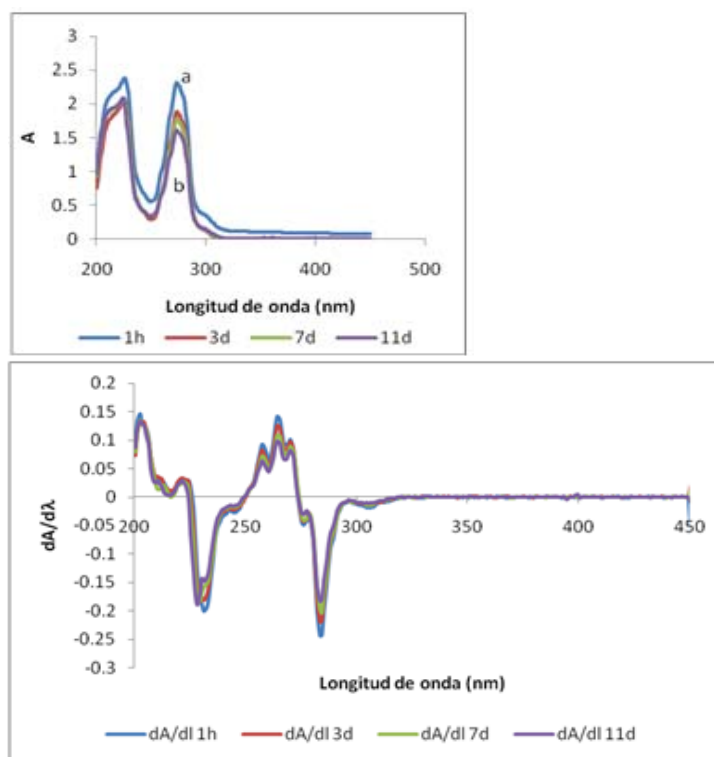


Fig. 2 Comportamiento de los espectros UV y de su primera derivada en el tiempo durante la degradación del 2-clorofenol por RS-11 sin adaptar sembrado en MMS con 2-CF 200 mg/L.

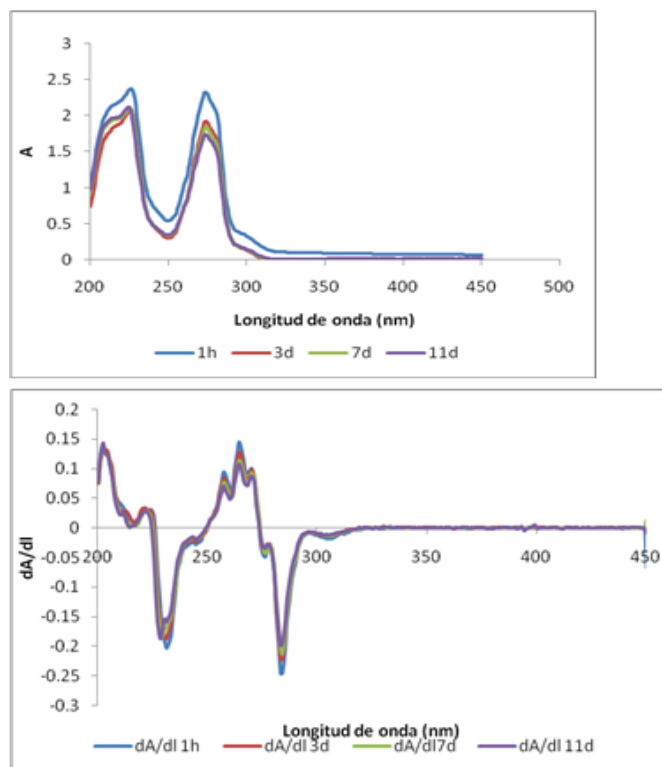


Fig. 3 Comportamiento de los espectros UV y de su primera derivada en el tiempo durante la degradación del 2-clorofenol por RS-13 sin adaptar sembrado en MMS con 2-CF 200 mg/L.

Los resultados al final del experimento (268 h, 11 días) mostraron un porcentaje de degradación del 2-clorofenol de aproximadamente 25-30 % en ambos aislados existiendo diferencias significativas con los resultados del inicio del experimento. Los resultados mostraron que los aislados evaluados, aún sin adaptar, son capaces de degradar el tóxico

ensayado pero requiriendo un tiempo más prolongado (ver figura 4).

Llamó la atención que se apreciara un mayor porcentaje de degradación en las primeras 96 h donde se debían encontrar las fases Lag y comienzo del crecimiento exponencial, lo que se ralentizó el proceso; esto es apoyado por la estimación de la velocidad específica de crecimiento, la cual mostró una desaceleración en el crecimiento, que pudiera ser producto de la toxicidad del compuesto a la concentración ensayada (datos no mostrados). Lo anterior pudiera estar en correspondencia con el comportamiento que se observó en el crecimiento.

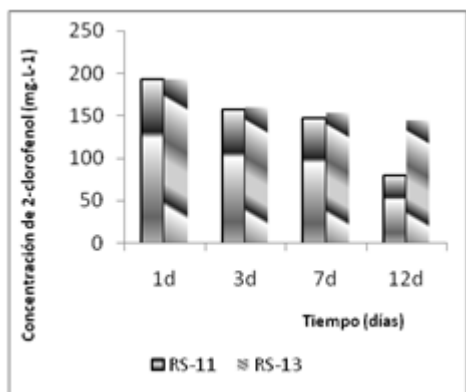


Fig. 4 Comportamiento de la concentración de 2-clorofenol en el tiempo en MMS inoculados con RS-11 y RS-13 previo al proceso de adaptación.

Evaluación de la degradación del 2-clorofenol por los aislados microbianos luego de la adaptación

El comportamiento de los máximos de absorbancia de los espectros mostró una disminución de estos a los 12 días (288 h) existiendo una diferencia significativa con el valor inicial (figuras 5 y 6).

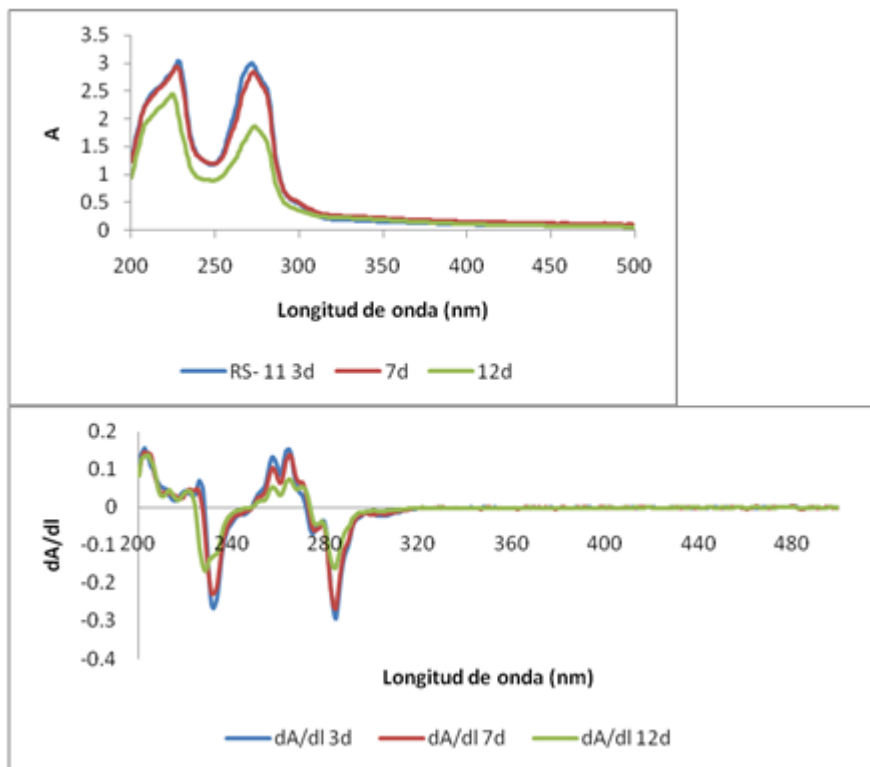


Fig. 5 Comportamiento de los espectros UV y de su primera derivada en el tiempo durante la degradación del 2-clorofenol por RS-11 adaptado sembrado en MMS con 2-CF 300 mg/L.

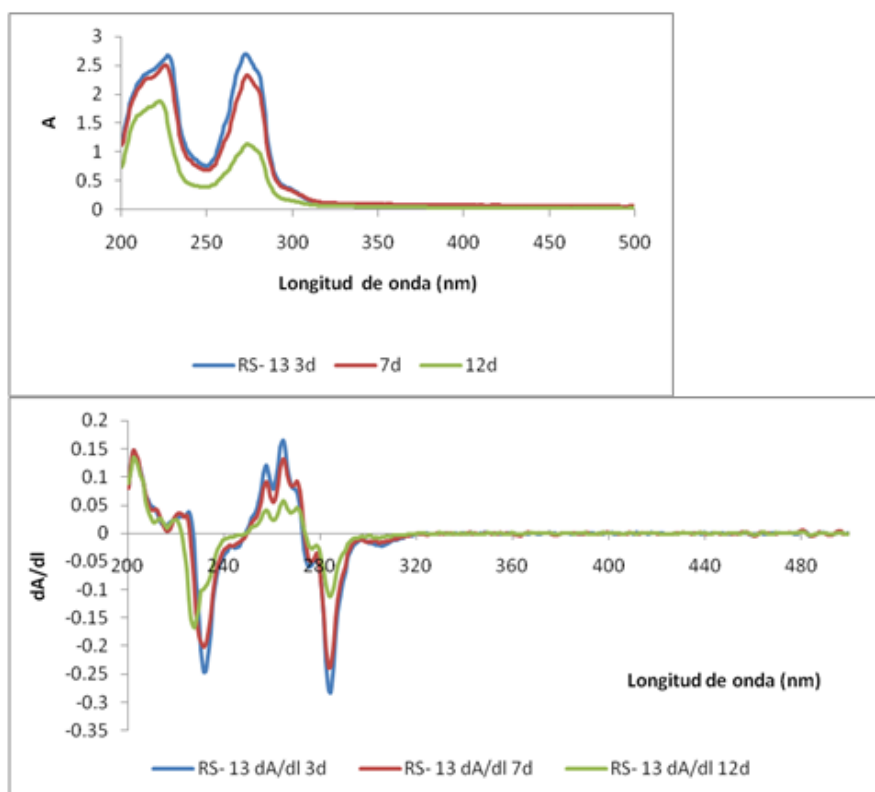


Fig. 6 Comportamiento en el tiempo de los espectros UV y de su primera derivada durante la degradación del 2-clorofenol por RS-13 adaptado y sembrado en MMS con 2-CF 300 mg/L.

Cuando se calculó la concentración del 2-CF a los diferentes tiempos se apreció una disminución de esta en las condiciones ensayadas (figura 7), observándose en este caso, además, un porcentaje de degradación del 56 % por RS-11 y 71 % por RS-13, existiendo diferencias significativas entre los resultados del inicio y el final del experimento, así

como los resultados obtenidos con los aislados sin adaptar para el mismo período de tiempo (figura 8). Lo anterior permitió afirmar que la estrategia de adaptación fue adecuada.

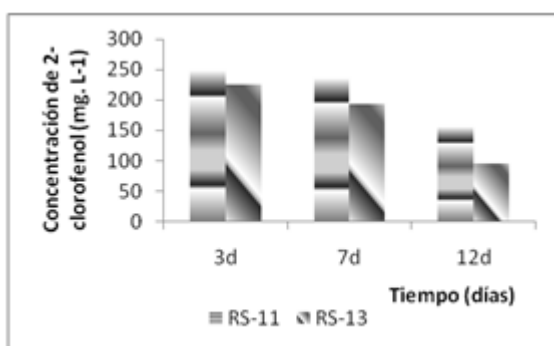


Fig. 7 Comportamiento de la concentración del 2-clorofenol en el tiempo en medio MMS inoculado con los aislados RS-11 y RS-13 luego de un proceso de adaptación.

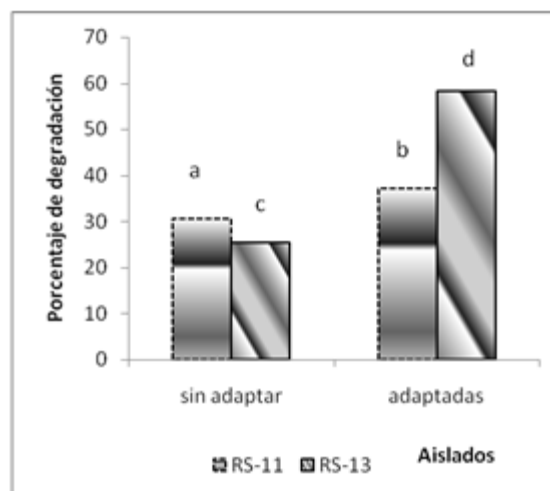


Fig. 8 Comportamiento del porcentaje de degradación entre los aislados RS-11 y RS-13 sin adaptar y luego de un proceso de adaptación.

Al igual que en el experimento de los aislados sin adaptar, cuando se analizó en más detalle el proceso de degradación, en ambos aislados se observó un mayor por ciento de degradación en los tres primeros días; el mismo disminuye en los siguientes tres días y vuelve a incrementarse en los próximos días; proceso que también coincide con una fase de crecimiento exponencial, uno estacionario y un segundo crecimiento exponencial (datos no mostrados). Esta observación sugiere que las bacterias pudieran estar utilizando el compuesto orgánico como fuente de carbono para su crecimiento.

El intervalo de muestreo no permitió observar el gradual descenso o la aparición de otros intermediarios. Además, los gráficos de los espectros no evidencian la acumulación de ninguno, lo cual en conjunto con el comportamiento microbiano sugiere que el microorganismo está utilizando este compuesto como fuente de carbono para su metabolismo.

A pesar de lo anteriormente expuesto, es posible que se acumule un intermediario en el interior de la célula que, no obstante, luego se utilice en la continuación del proceso para la utilización como fuente de carbono, en un momento lentifique el proceso de degradación y sea la causa de la demora que se observa entre los 3 y 7 días. Este puede ser un producto más tóxico o de una estructura más difícil de metabolizar.

Durante los experimentos desarrollados no se observó otro máximo de absorción además del que coincidió con el mostrado por el control sin inocular, ni se apreció la aparición de coloración parda indicativa de la posible acumulación de un intermediario (semialdehído-2-hidroxiácido) en el medio de cultivo. La evaluación de los gráficos de la primera derivada de los espectros tampoco arrojó la existencia de un intermediario significativo que estuviera dado por la aparición de otro cero en dichos gráficos.

La reducción de los máximos de absorbancia esperados en los diferentes experimentos ofreció una idea de la disminución de la concentración del compuesto en el medio. La ausencia de otro máximo durante el transcurso del tiempo puede ser un indicio de la necesidad de reducir los intervalos de toma de muestras o que la cepa ensayada metabolizó los

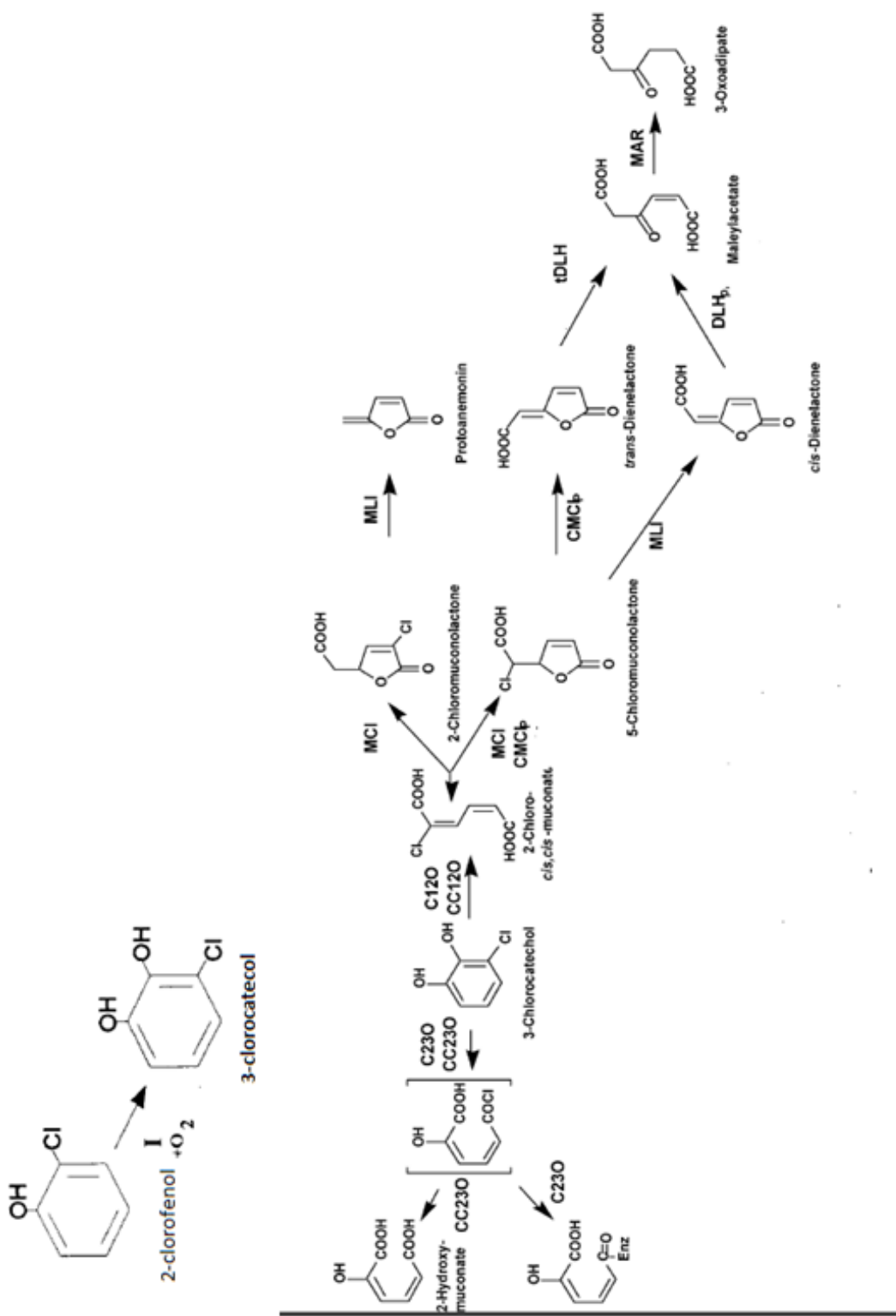
intermediarios que se fueron formando durante la degradación del 2-CF incorporándolos en su metabolismo, por lo que se puede sugerir que la degradación es completa.

Durante la degradación de un compuesto pueden formarse intermediarios que: 1) se acumulen dentro de las células o en el propio medio de cultivo, que pueden no ser útiles o ejercer acción tóxica para el microorganismo, y 2) continuar su transformación en otros compuestos para ser utilizados como fuente de carbono y/o energía.

Todavía se desconoce cuál es la vía por la que degradan el compuesto los aislados ensayados. La literatura informa que existen dos formas de transformar los compuestos fenólicos clorados: la de cloración reductiva, que es típica de las bacterias anaerobias, las cuales eliminan los átomos de cloro de manera sucesiva por medio de enzimas dehalogenasas y la de cloración oxidativa o biodegradación aerobia, donde se forman, principalmente los catecoles clorados /19/. Estos últimos se degradan por las vías orto y meta según la ruptura del clorocatecol se haga intra o extradiol, respectivamente. Por lo general, en los compuestos monoclorados la liberación del cloro ocurre de una manera espontánea.

La degradación del 2-CF se ha documentado que sigue la vía de los clorocatecoles con la formación del 3-clorocatecol. Si la ruptura del 3-clorocatecol ocurre por la vía meta, posición extradiol, el producto formado se ha informado que se une de manera irreversible con la enzima que debiera degradarlo (clorocatecol-2,3-dioxigenasa), impidiendo su acción o da lugar a un intermediario altamente reactivo que hace el mismo efecto pero antes libera cloro, aunque no la cantidad esperada, indicando degradación incompleta.

El intermediario formado se acumula en el medio de cultivo dando una coloración parda /2/. Este último compuesto ya no puede utilizarse como fuente de carbono, por lo que el microorganismo está obligado a crecer a expensas de otra fuente alternativa, de lo contrario, perece (figura 9).



Donde I: tenoi microxigenasa; C230: catecol-2,3-dioxigenasa; C120: clorocatecol-2,3-dioxigenasa; C120: catecol-1,2-dioxigenasa; CC120: clorocatecol-1,2-dioxigenasa; MCI: muconato cicloisomerasa; CMCP: cloromuconato cicloisomerasa de protobacteria; MLI: muconolactona isomerasa; DLHp: dienolactona hidrolasa de protobacteria; tDLH: trans dienolactona hidrolasa; MAR: maleilacetato reductasa. /2, 20/.

Si ocurre por medio de la vía orto, el 3-clorocatecol se rompe en la posición intradiol, mediante la clorocatecol-1,3-dioxigenasa, llegando a formar el 3-oxoadipato, logrando que el 2-CF se degrade de manera completa, pues a partir de este se genera una serie de intermediarios que entran al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (figura 9)/21, 20/.

En los experimentos realizados, el medio ensayado se mantuvo transparente o ligeramente turbio blanco con el crecimiento del microorganismo, lo cual indicó que no se estuvo acumulando en el mismo ningún intermediario coloreado.

La observación anterior se interpreta como ocurrencia de una degradación completa, la que, según la literatura, generalmente solo es posible cuando el 3-clorocatecol formado es degradado por la vía orto.



Conclusiones

La degradación ensayada con los cultivos aislados utilizando la técnica de espectrofotometría derivativa no solo demostró que ocurría la degradación, sino que era necesaria la adaptación de los microorganismos al compuesto orgánico para mejorar la velocidad de degradación del compuesto por los aislados ensayados.



Bibliografía

1. ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation*. California, USA: Ed. Academic Press, 1994.
2. FARRELL, A.; QUILTY, B. "Degradation of Mono-Chlorophenols by a Mixed Microbial Community Via a Meta-Cleavage Pathway". *Biodegradation*. 1999, vol. 10, p. 353-362.
3. GALLEGO, A., *et al.* "Factors Affecting Biodegradation of 2-Chlorophenol by *Alcaligenes sp.* in Aerobic Reactors". *Environmental Toxicology*. 2001, vol. 16, no. 4, p. 306-313.
4. FARRELL, A.; QUILTY, B. "Substrate-Dependent Autoaggregation of *Pseudomonas putida* CPI During the Degradation of Monochlorophenols and Phenol". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002, vol. 28, p. 316-324.
5. BAGGI, G.; CAVALCA, L.; FRANCA, P.; ZANGROSSI, M. "Chlorophenol Removal from Soil Suspensions: Effects of a Specialised Microbial Inoculum and a Degradable Analogue". *Biodegradation*. 2004, vol. 15, p. 153-160.
6. HERRERA, Y.; OKOH, A. I.; ÁLVAREZ, L.; ROBLEDO, N.; TREJO HERNÁNDEZ, M. R. "Biodegradation of 2,4-Dichlorophenol by *Bacillus consortium*". *World J Microbiol Biotechnol*. 2008, vol. 24, p. 55-60.
7. AL THANI, R.; ABD EL HALEEM, D.; AL SHAMMARI, M. "Isolation, Biochemical and Molecular Characterization of 2-Chlorophenol Degrading *Bacillus isolates*". *African J. of Biotechnol*. 2007, vol. 6, no. 23, p. 2675-2681.
8. GOSWAMI, M.; SHIVARAMAN, N.; SINGH, R. P. "Microbial Metabolism of 2-Chlorophenol, Phenol and P-Cresol by *Rhodococcus erythropolis* M1 in Co-Culture with *Pseudomonas fluorescens* P1". *Microbial Research*. 2005, vol. 160, p. 101-109.
9. LIN, J.; REDDY, M.; MOORTHI, V.; QOMA, B. E. "Bacterial Removal of Toxic Phenols from an Industrial Effluent". *African J. of Biotechnol*. 2008, no. 13, p. 2232-2238.
10. EL-SAYED, W.; ISMAEIL, M.; EL-BEIH, F. "Isolation of 4-Chlorophenol Degrading Bacteria *Bacillus subtilis* OS1 and *Alcaligenes sp* OS2 from Petroleum Oil-Contaminated Soil and Characterization of its Catabolic Pathway". *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009, vol. 3, no. 2, p. 776-783.
11. ARESTA, M. *et al.* "Isolation and Characterization of Poliphenols-Degrading Bacteria from Olive-Mill Wastewater Polluted Soil". *World J. Microbiol Biotechnol*. 2010, vol. 26, p. 639-647.
12. ANNACHHATRE, A. P.; GHEEWALA, S. H. "Biodegradation of chlorinated phenolic compounds". *Biotechnol Adv*. 1996, vol. 14, p. 35-56.
13. WANG, L.; ASGHARNEJAD, M. "Second Derivative UV Spectrometric Determination of Simvastatin in its Tablet Dosage Form". *J. Pharm Biomed. Anal*. 2000, vol. 21, p. 1243-1248.
14. KAZEMIPOUR, M.; NOROOZIAN, E.; TEHRANI, M. S.; AHMOUDIAN, M. "A New Second-Derivative Spectrophotometric Method for the Determination of Permethrin in Shampoo". *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2002, vol. 30, p. 1379-1384.
15. HASSAN, E. M. "Determination of Ipratropium Bromide in Vials Using Kinetic and First-Derivative Spectrophotometric Methods". *J. Pharm Biomed. Anal*. 2000, vol. 21, p. 1183-1189.
16. KARPINSKA, J.; MIKOLUC, B.; PIOTROWSKA, J. "Application of Derivative Spectrophotometry for Determination of Coenzyme Q10 in Pharmaceuticals and Plasma". *J. Pharm. Biomed. Anal*. 1998, vol. 17, p. 1345-1350.
17. GAUGLITZ, G. *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*. Wiley-VCH, Weinheim Verlag: GmbH & Co. KGaA, 2005.

18. GONZÁLEZ, B.; ACEVEDO, C.; BREZNY, R.; JOYCE, T. "Metabolism of Chlorinated Guaiacols by a Guaiacol-Degrading *Acinetobacter junii* strain." *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, vol. 59, no.10, p. 3424-3429.
19. HAGGBLOM, M.; VALO, R. "Bioremediation of Chlorophenol Wastes". In: *Microbial transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Ed. Youn L. Cerniglia C. Wiley-Liss, 1995.
20. PIEPER, D. "Aerobic Degradation of Polychlorinated Biphenils". *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005, vol. 67, p. 170-191.
21. FETZNER, S.; LINGENS, F. "Bacterial Dehalogenase: Biochemistry, Genetics and Biotechnological Applications". *Microbiological Review*. 1994, vol. 58, no. 4, p. 641-685.