

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



**CARACTERIZACIÓN DE BIOSENSORES BACTERIANOS PARA LA DETECCIÓN DE  
COMPUESTOS ORGANOCLORADOS EN EFLUENTES DE PULPA KRAFT.**

Tesis presentada a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Magister en Ciencias, mención Microbiología

Por

VICTOR LEANDRO CAMPOS ARANEDA

2004

## RESUMEN

Existe un consenso de que los principales contaminantes, de mayor impacto ambiental, se generan en los procesos de blanqueo de pulpa kraft. La U.S. Environmental Protection Agency (EPA), publicó recientemente las proposiciones de normas para regularizar las emisiones de compuestos organoclorados. Debido a esto se hace necesario contar con técnicas que permitan detectar en forma eficiente compuestos contaminantes en los efluentes, debido a que los métodos químicos frecuentemente utilizados son muy complejos y de alto costo operacional. Los biosensores bacterianos surgen como una técnica potencial, por su simplicidad, rapidez y bajo costo, para la detección de contaminantes organoclorados.

La capacidad de detectar compuestos fenólicos y derivados clorados por las cepas mutantes DmpR B9, B23 y B24 fue estudiada mediante ensayos líquidos de  $\beta$ -galactosidasa. La actividad  $\beta$ -galactosidasa es proporcional a la transcripción de la fusión *Pdmp-lacZ* de las cepas mutantes DmpR, en presencia de compuestos fenólicos y derivados clorados. Los ensayos fueron realizados testeando la lista de contaminantes fenólicos prioritarios descrito por la EPA (1998). Se demostró que los 9 compuestos fenólicos clorados ensayados fueron capaces de inducir respuesta por parte de los tres biosensores bacterianos. Las cepas mutantes DmpR presentan las más altas respuestas en presencia de fenol y de compuestos fenólicos mono-clorados, así observándose una baja inducción por parte de 3-cloro-4-metilfenol; 2,4-dimetilfenol; 2,4,6-triclorofenol y 2,4,5-triclorofenol. Entre los compuestos tóxicos prioritarios no detectados por las cepas mutantes DmpR se encuentra el 2-metil-4,6-dinitrofenol. A concentraciones sobre 75  $\mu$ M del 2,4,6-triclorofenol y 50  $\mu$ M de pentaclorofenol, producen lisis celular. Los ensayos realizados con 2,4-dinitrofenol demostraron una inducción variable de la fusión *Pdmp-lacZ*. Ensayos con tolueno, Xileno, Benceno, 2-nitrotolueno, 2,4-D y 2,4,6-TBF, no indujeron respuesta por parte de las cepas mutantes.

La cinética de inducción de las cepas mutantes en presencia de mezclas de compuestos fenólicos sustituidos demostró una respuesta lineal hasta 75  $\mu$ M, no se observó inhibición en la respuesta cuando las cepas mutantes DmpR fueron

incubadas en mezclas de compuestos fenólicos y derivados clorados con tolueno, benceno y xileno, en cambio en presencia de 2,4,6-Tribromofenol y 2,4-D a concentraciones sobre 75  $\mu\text{M}$  se observan respuestas variables de las tres cepas mutantes.

Los resultados demostraron que las cepas mutantes DmpR presentan un crecimiento estable en los efluentes de pulpa kraft estudiados; además fueron capaces de detectar la presencia de compuestos fenólicos sustituidos. Se detectó una mayor concentración de compuestos organoclorados en el efluente con índice kappa mayor. La caracterización de los efluentes por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no arrojó resultados satisfactorios, esto se debe principalmente a la gran cantidad de compuestos que son generados durante el blanqueo de la pulpa kraft.

Existen muchos reportes sobre la construcción de biosensores bacterianos, pero existen pocos los trabajos que demuestra la capacidad de detectar compuestos químicos en muestras ambientales. En este estudio se demostró la capacidad de tres cepas mutantes DmpR, B9, B23 y B24, basada en la activación de la fusión *Pdmp-lacZ*, para la detección de fenol y derivados clorados en efluentes de pulpa kraft. Los biosensores bacterianos presentan una alta sensibilidad y esto permite utilizarlos como una alternativa a los análisis químicos comúnmente empleados para compuestos orgánicos. Otro aspecto importante es destacar su bajo costo, rapidez y adaptabilidad a análisis de campo o para monitoreos “*in situ*”.