

## **AISLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE SUELOS TRATADOS CON PESTICIDAS, POTENCIALMENTE UTILIZABLES EN BIORREMEDIACIÓN**

---

### **ISOLATION OF BACTERIA FROM SOILS TREATED WITH PESTICIDES POTENTIALLY USABLE IN BIOREMEDIATION**

---

Recibido: 02-11-2008 / Aceptado: 23-03-2009 **Molina-Quintero<sup>1</sup>, L.; Medina-Ramírez<sup>2</sup>, G. y Grassi H.C<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología. Programa de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto- Venezuela. e-mail: *luisamolina@ucla.edu.ve*

<sup>2</sup>Sección Biotecnología, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela e-mail: *medinag@ula.ve*

<sup>3</sup> Sección Biotecnología, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela e-mail: *cocoa01@etheron.net*

#### **RESUMEN**

La presente investigación tiene como propósito, evaluar bacterias del suelo capaces de crecer en presencia de pesticidas, biodegradando y/o detoxificando los pesticidas agregados a medios de cultivo. Para ello se recolectaron muestras de suelos en dos poblaciones del Estado Mérida, Venezuela y se procedió a realizar el aislamiento bacteriano en medios de cultivo mínimos y ricos, suplementados con glicerol con y sin pesticidas (Paratión, Paraquat y DDT). Bajo estas condiciones el crecimiento de los clones aislados estuvo favorecido en medio mínimo de cultivo suplementado con Paratión o DDT, indicando que en ausencia de una fuente de carbono adecuada, estos pesticidas pueden ser metabolizados. La detoxificación de los medios suplementados con los pesticidas se evaluó utilizando el bioensayo de toxicidad sobre *Artemia salina*. Se encontró que la mayoría de los clones bacterianos logró disminuir la toxicidad del medio de cultivo, y se encontró una disminución general al considerar el promedio de todos los clones y compararlo con el control sin microorganismos. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que algunos de los microorganismos aislados podrían ser utilizados en biorremediación.

**Palabras claves:**  *biorremediación, pesticida, microorganismos*

#### **SUMMARY**

The present research focuses on the evaluation of soil bacteria which are able to grow in the presence of pesticides, biodegrading them and/or detoxifying the culture media. Soil samples were collected in two different allocations of Estado Mérida, Venezuela and bacteria were isolated in minimal and rich media which were supplemented with glycerol as the sole Carbon and energy source, with or without pesticides (Parathion, Paraquat and DDT). Under the conditions of this paper, the growth of the isolated clones was favoured in minimal culture media supplemented with Parathion or DDT, indicating that under the absence of a suitable carbon source, these pesticides could be metabolized. The detoxification of culture media supplemented with pesticides with or without microorganisms was evaluated using a toxicity assay on *Artemia salina*. We found that most of the bacterial clones had the ability to decrease toxicity of the culture media, showing an overall decrease in toxicity when the mean value for all the clones was compared with the control without microorganisms. The results indicate that some of the isolated microorganisms may be used in bioremediation.

**Key words:**  *bioremediation, pesticide, microorganisms*

## INTRODUCTION

El uso de compuestos químicos en la agricultura ha supuesto un beneficio sustancial en la producción, un ejemplo de esto es el empleo de pesticidas y fertilizantes, que han favorecido un incremento significativo en las cosechas, mejorando en gran medida el rendimiento económico (Hotchkiss 1992; Ferrer 2003); además es indudable el beneficio derivado del empleo de los pesticidas en los programas de salud y en la lucha contra vectores o huéspedes transmisores de enfermedades (Maroni et al. 1993); sin embargo, existe la contraparte que indica que estos compuestos pueden ser potencialmente peligrosos para la vida animal y humana, debido a que el abuso en su aplicación ha producido una amplia e importante dispersión en el medio ambiente, con consecuencias graves para el hábitat y para todas las especies, debido a su toxicidad, a su persistencia y a la rápida movilización de estos productos a través del agua, aire y suelo (Gutiérrez et al. 2000). De particular interés son los efectos negativos generados sobre la microbiota del suelo, determinante en los procesos de descomposición y mineralización de la materia orgánica en putrefacción, lo cual incidiría directamente y de manera negativa sobre el suelo haciéndolo disminuir su calidad y por ende su productividad.

Estudios realizados por Haraama (1999) y Senior et al. (1990), han aportado múltiples opciones en el uso de bacterias nativas de los sitios sometidos a la influencia de distintos contaminantes, las cuales han adquirido una capacidad sustantiva para poder sobrevivir en esas condiciones, pues se han adaptado aprovechando como sustrato los pesticidas y los compuestos derivados de ellos, degradándolos y transformándolos a otros menos nocivos como por ejemplo dióxido de carbono. Estos organismos pueden ser utilizados como herramientas para la descomposición y eliminación de pesticidas presentes en suelos contaminados (Cabrera 1982). Una aplicación

de gran relevancia (Arrambarri *et al.* 1994) es la "Biorremediación de suelos contaminados con pesticidas", tecnología basada en la utilización de microorganismos que poseen la capacidad de degradar los mismos, para lo cual se requiere la optimización de factores esenciales para el metabolismo de dichos microorganismos, tales como concentración de nutrientes, contenido de agua, pH, oxígeno y temperatura (Singh 2002). La biorremediación es por tanto una metodología de gran interés para la recuperación de suelos. En consecuencia el presente estudio tiene como objetivo aislar bacterias a partir de muestras de suelos tratados con pesticidas, que puedan tener la capacidad de metabolizar dichos compuestos químicos y de detoxificar Medios de Cultivo suplementados con pesticidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización de las Muestras de Suelo

Se recolectaron al azar, 7 muestras de suelo del Estado Mérida, Venezuela, (5 de la población de Bailadores y 2 de la población de Santa Cruz de Mora), para lo cual se eliminó la cubierta vegetal superficial del suelo y se procedió a recolectar muestras con un peso aproximado de 1 Kg. correspondiente al material entre 0 y 30 cm. de profundidad del suelo. Así, mismo se midió la temperatura del suelo y se realizó un estudio de las prácticas agrícolas desarrolladas en el lugar.

### Aislamiento Bacteriano

Las muestras de suelo se procesaron inmediatamente después de su recolección, y se procedió a realizar el aislamiento bacteriano de la siguiente manera: se mezclaron 5 g de cada muestra de suelo con 10 mL de agua destilada estéril, se dejó en reposo por 2 horas y luego se decantaron los sobrenadantes (extracto de suelo) los cuales fueron utilizados como inóculos. El aislamiento bacteriano se llevó a cabo en Medio Básico (MB) (Duarte *et al.* 2001) modificado por los autores, el cual contiene la siguiente composición (por litro): Glicerol 2g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  4g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  4g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2g,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,2g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,001g,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,001g, Agar purificado 13g; así como también en Medio Rico (MR) (Duarte *et al.* 2001), que tiene la misma composición del MB y adicionalmente contiene

extracto de levadura 2 g/L. Se procedió a inocular 100  $\mu$ L del extracto en los medios de cultivo, por la "Técnica de siembra en placa por extensión"; las placas se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas.

### Evaluación del Crecimiento Bacteriano sobre los Medios de Cultivo suplementados con Pesticidas

Se escogieron clones al azar a partir del ensayo anterior y se sembraron en los medios de cultivo MB, MR y Medio Tripticasa Soya (ATS), sin pesticidas y en placas con dichos medios de cultivo suplementados con los pesticidas Paratión (2mg/mL), Paraquat (0.8mg/mL) y DDT (40mg/mL). Las placas se incubaron a temperatura ambiente y se realizaron observaciones del crecimiento bacteriano cada 24 horas.

### Evaluación de la Toxicidad de los sobrenadantes de Medios de Cultivo sobre *Artemia salina*

Se realizó un bioensayo para evaluar la toxicidad de los medios de cultivo suplementados con pesticidas, frente al monitor biológico *Artemia salina*, según el procedimiento descrito por Jiménez (1994); el cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

**Eclosión de los Huevos:** Se oxigenó 250mL de Solución Marina (NaCl 27g, MgSO<sub>4</sub> 7,06g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5,18g, KCl 0,697g, NaHCO<sub>3</sub> 0,143g, KBr 0,102g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,035g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,026g, MgF<sub>2</sub> 0,015g, KF 0,0001g, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1,54g y agua CSP 1L.) durante 48 horas. Se procedió a agregar 20mg de huevos de *Artemia salina* y se continuó con el procedimiento de oxigenación por un espacio de 24 horas, periodo en el cual ocurre la eclosión y aparición de los *nauplii*.

**Experimento:** En microplacas de 96 pozos se agregaron 150 $\mu$ L de Solución Marina en cada pozo, luego se adicionó 5 $\mu$ L de Solución Marina que contiene los *nauplii* y 5 $\mu$ L de una solución de levadura comercial, (50mg/mL), se incubó la placa a temperatura ambiente por 24 horas bajo luz artificial. Posteriormente se contaron los individuos muertos y

se agregó 15 $\mu$ L de sobrenadante de los cultivo en cada pozo, se incubó de nuevo la placa a temperatura ambiente por 24 horas bajo luz artificial, por último se procedió a contar los individuos muertos y a determinar el porcentaje de mortalidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de las Muestras de Suelo

De las muestras de suelo recolectadas, el 71,42% correspondió al tipo "Franco-arenoso", las cuales se derivan de la recolección efectuada en la población de "Bailadores", mientras que 28,28% pertenecen al tipo "Arenoso" correspondientes a las muestras obtenidas en la población de "Santa Cruz de Mora"; sus temperaturas oscilaron entre 18°C y 23°C. Algunos suelos presentaban cultivos para el momento de la recolección de las muestras, coincidiendo con la aplicación de diferentes tipos de pesticidas, mientras que otros sólo se estaban tratando con dichos compuestos químicos; se tomó como control un suelo que no había sido intervenido desde el punto de vista químico ni agrícola por al menos 15 años, según la información obtenida de la información recabada (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características De Los Suelos

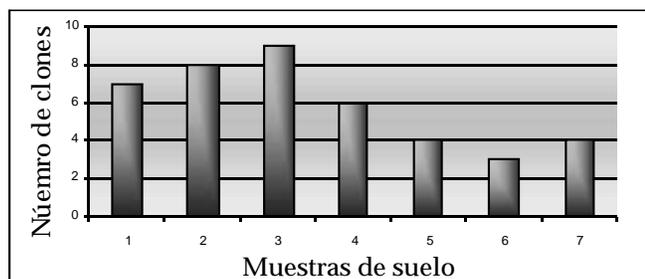
Nº de Muestra	Ubicación Geográfica	Tipo de suelo	Temperatura del suelo	Cultivo	Pesticida aplicado
1	Bailadores	Franco Arenoso	18°C	Repollo	Aminoglicósido/ Fungicida-bactericida (Kasumin). Control Biológico (Trichoderma)
2	Bailadores	Franco Arenoso	19°C	Repollo	Carbamato (Benlate)
3	Bailadores	Franco Arenoso	19°C	Sin cultivo	Benzamida (Match)
4	Bailadores	Franco Arenoso	19°C	Sin cultivo	Organofosforado (Tamaron)
5	Bailadores	Franco Arenoso	18°C	Sin cultivo	Sin aplicación por más de 15 años. Muestra Control
6	Santa Cruz de Mora	Arcilloso	24°C	Flores	Organofosforado (Curacron, Malation). Formol
7	Santa Cruz de Mora	Arcilloso	23°C	Sin Cultivo	Organofosforado (Malation). Sulfato Cúprico

### Evaluación del Crecimiento Bacteriano

El crecimiento bacteriano, comenzó a ser notable luego de 24 horas de incubación en MR para todas las muestras, mientras que en MB comenzó a manifes-

tarse más tardíamente. En relación con la cantidad de clones aislados en cada muestra de suelo se obtuvo que la mayor cantidad de ellos, correspondió a la muestra número 3, mientras que la menor cantidad estuvo relacionada con la muestra número 6 (Figura 1).

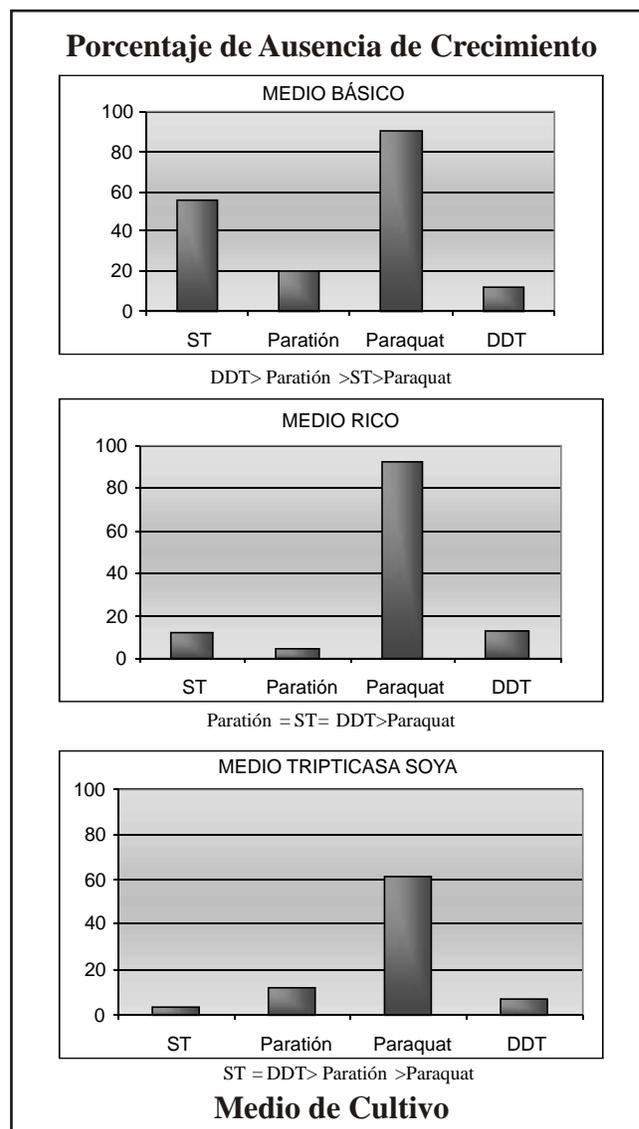
El menor crecimiento bacteriano manifestado por las muestras 7, puede ser atribuible a la adición en el suelo de formol, que es un agente esterilizante, junto a dos pesticidas organofosforados en altas concentraciones, según lo indicado por los agricultores, lo cual afectar el crecimiento bacteriano; dicho efecto es comparable con los resultados de Luo *et al.* (2004), quienes obtuvieron un decrecimiento en la diversidad microbiana de suelos tratados con el pesticida "Fenvalerate" luego de un período de 40 días, de igual manera otros estudios llevados a cabo por Widenfalk *et al.* (2004) demostraron una disminución de 20 a 24% de la actividad bacteriana en suelos tratados con los pesticidas Captan, Isoprototom, Detametrin y Pirimicarb.



**Figura 1.** Cantidad de clones bacterianos aislados a partir de las muestras de suelo

En la Figura 2 se puede observar la influencia de cada tipo de pesticida y medio de cultivo, sobre el crecimiento bacteriano, expresado en este caso como porcentaje de ausencia de crecimiento. Se obtuvo que el Paraquat resultó ser el pesticida más tóxico, ya que en los medios de cultivo suplementados con el mismo, se manifestaron los mayores porcentajes de ausencia de crecimiento, mientras que el crecimiento bacteriano estuvo favorecido por Paratión y DDT, ya que presentaron los menores porcentajes de ausencia de crecimiento, en comparación con los medios de cultivo sin tratamiento (es decir en ausencia de pesticida). Al comparar todos los pesticidas en un mismo medio se puede ver que en el MB los pesticidas Paratión y DDT estimulan el crecimiento,

mientras que Paraquat lo inhibe, ya que se manifestó casi 100% de ausencia de crecimiento. De manera global, se observa que en los dos medios ricos (MR y ATS), Paratión y DDT afectan ligeramente el crecimiento, mientras que Paraquat lo inhibe de manera evidente. En MB, aunque el Paraquat presenta el mismo efecto inhibitorio, Paratión y DDT estimulan el crecimiento microbiano, lo que indica que el medio adecuado para este tipo de estudio, es el MB.



ST: Medio de Cultivo Sin Tratamiento

Al pie de cada gráfica se muestra de manera comparativa la relación de crecimiento en orden decreciente de izquierda a derecha, entre todos los tratamientos.

**Figura 2.** Comparación del crecimiento bacteriano entre los medios de cultivo suplementados con pesticidas.

Todo pareciera indicar que mientras el medio es más rico, se expresa la toxicidad de todos los compuestos y mientras el medio es más pobre, el efecto tiende más a la estimulación del crecimiento. Esto se puede explicar cualitativamente porque los blancos de acción de estos tóxicos se expresan más mientras el medio es rico o también, de una manera cuantitativa porque las células se hacen más vulnerables en la medida en que el crecimiento es mayor. Esta conclusión coincide con una toxicidad decreciente de los pesticidas Paraquat >Paratión >DDT, y con la riqueza decreciente de los medios de cultivo ATS >MR >MB. De esta manera nuestros resultados indican que se puede esperar que la combinación de mayor toxicidad sea Paraquat en Tripticasa Soya y de menor toxicidad sea DDT en MB lo cual estaría de acuerdo con lo reportado en la bibliografía y a que el DDT no altera la microflora bacteriana del suelo (Salonius 1972).

Relacionando el crecimiento bacteriano (en términos del número de clones) con la muestra de suelo del cual se obtuvieron, se tiene que aquellos clones originalmente aislados a partir de la muestra 6 (suelo tratado con organofosforados y formol) y repicados sobre MR, MB y estos mismos medios suplementados con Paratión y DDT, presentaron 0% de crecimiento bacteriano. Las muestras 2 y 3 fueron las que presentaron mayor porcentaje de crecimiento. El control (muestra 5) no presentó crecimiento bacteriano (Figura 3). Esto indica que los microorganismos aislados de las muestras 5 y 6 no se mantuvieron viables bajo estas condiciones, mientras que aquellos de las muestras 2 y 3 (suelos tratados con carbamato y benzamida, respectivamente), mantuvieron la mayor viabilidad.



**MB:** Medio Básico; **MR:** Medio Rico; **MB+DDT:** Medio Básico suplementado con **DDT**; **MB+P:** Medio Básico suplementado con Paratión

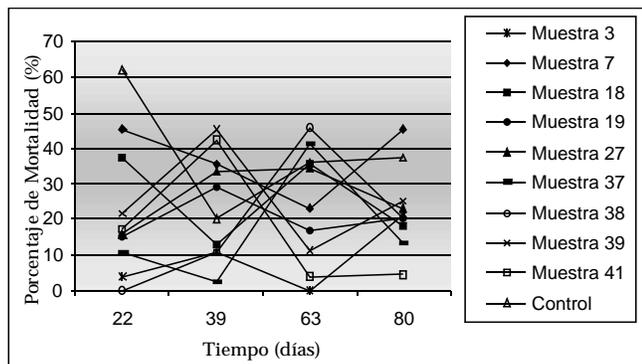
**Figura 3.** Porcentaje de crecimiento bacteriano, de clones cultivados según las muestras de suelo

De la población bacteriana evaluada, se seleccionaron 11 clones para realizar los ensayos de toxicidad sobre *Artemia salina*. De los sobrenadantes de MB suplementado con Paratión, se puede destacar que el porcentaje de muestras que reducen la toxicidad con respecto al control (medio de cultivo con pesticidas y en ausencia de microorganismos) aumentan en función del tiempo, de esta manera a los 39 días, 44,44% de muestras fueron menos tóxicas que el control, a los 63 días 66,66% manifestaron dicho efecto y a los 80 días, 88,88% presentaron porcentaje de mortalidad menor que el control. En la Figura 4-a se muestra el porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* por efecto de los sobrenadantes de cultivo (en MB con paratión) de cada uno de los nueve clones seleccionados y en la Figura 4-b, se muestra el promedio del porcentaje de mortalidad de los sobrenadantes de cultivo de los mismos clones, en comparación con el control que contiene MB con Paratión y sin microorganismos.

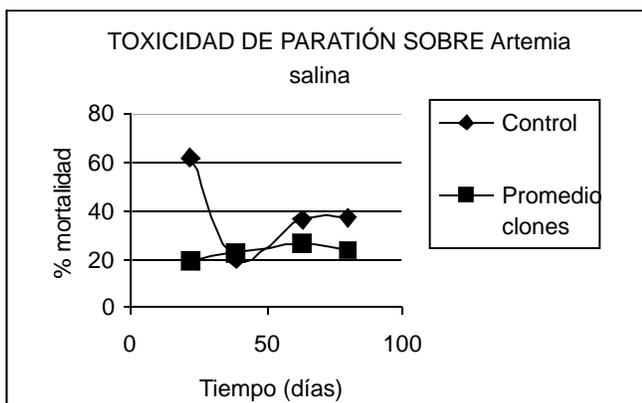
En cuanto a los sobrenadantes de Medio de Cultivo (MB) suplementado con DDT se obtuvo, que el control al comienzo del ensayo (22 días) produjo 0% de mortalidad y fue aumentando progresivamente; se observó que a los 80 días 55,55% de los clones disminuyeron su toxicidad en los Medios de Cultivo con respecto al control, 11,11% lograron 0% de mortalidad en *Artemia salina*, mientras que solo 33,33% presentaron un aumento de la toxicidad. En la Figura 5-a se muestra el porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* por efecto de los sobrenadantes de cultivo (en MB con DDT) de cada uno de los nueve clones seleccionados y en la Figura 5-b, se muestra el promedio del porcentaje de mortalidad de los sobrenadantes de cultivo de los mismos clones, en comparación con el control que contiene MB con DDT y sin microorganismos.

En estas experiencias se puede observar que para ambos pesticidas (Paratión y DDT) se presentan oscilaciones de la toxicidad, probablemente debido a transformaciones de estos productos en solución, mientras que la presencia de los microorganismos da niveles constantes de toxicidad que representan un 33% del máximo alcanzado por el pesticida solo. Adicionalmente se puede observar que el Paratión en

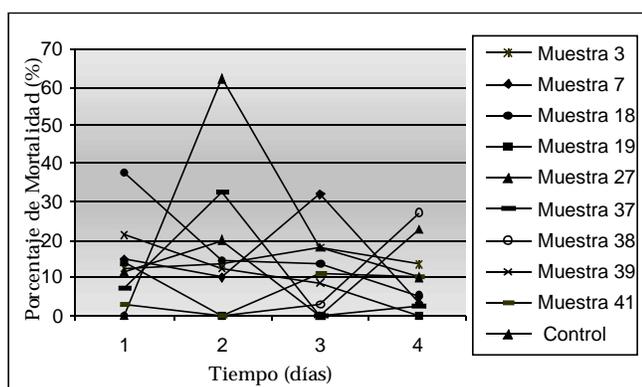
solución llega hasta un valor de 40% de mortalidad de *Artemia salina*, mientras que en presencia de microorganismos se logra, en promedio, reducir esa mortalidad a la mitad.



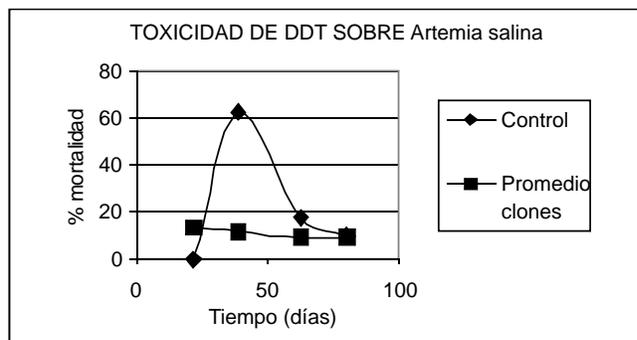
**Figura 4-a.** Toxicidad de los sobrenadantes de Medio de Cultivo suplementados con Paratión sobre *Artemia salina*: Comportamiento de los clones por separado.



**Figura 4-b.** Comportamiento promedio de los clones.



**Figura 5-a.** Toxicidad de los sobrenadantes de Medio de Cultivo suplementados con DDT sobre *Artemia salina*: Comportamiento de los clones por separado.



**Figura 5-b.** Comportamiento promedio de los clones.

Resultados obtenidos por Varo *et al.* (2002) con otros pesticidas organofosforados, demuestran que se produjo una mortalidad de 20%, manifestando baja toxicidad sobre *Artemia salina*, con respecto al control. Los sobrenadantes de medio de cultivo suplementados con DDT, presentaron mayor porcentaje de mortalidad que aquellos con Paratión; los altos porcentajes de toxicidad mostrados en este caso por el control, son comparables con los resultados obtenidos por Nimmo *et al.* (1970) y Nimmo *et al.* (1972), en bioensayos en los que *Artemia salina* demostró ser el crustáceo más sensible a los pesticidas organoclorados, específicamente DDT, dicho efecto se debe a la elevada acumulación del DDT en el hepatopáncreas de dichos organismos.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se obtuvieron números variables de microorganismos de las diferentes muestras de suelo evaluadas. En nuestra experiencia, el tratamiento de suelos con organofosforados parece estar asociado con un menor número de microorganismos.
- Los microorganismos se adaptan mejor a Paratión y DDT en medios de cultivo mínimos (MB) que a los mismos pesticidas en medios ricos, mientras que el efecto de Paraquat parece ser independiente del medio de cultivo.
- En esas condiciones de medio mínimo (MB), los microorganismos logran mantener niveles bajos de toxicidad sobre *Artemia salina*, en presencia de Paratión y DDT, los cuales podrían ser degradados por los microorganismos existiendo posiblemente un efecto del tipo de represión por catabolitos. La

disminución de la toxicidad generada por los pesticidas Paratión y DDT por acción de los clones bacterianos estudiados en el presente trabajo, nos indica que dichos organismos pueden ser utilizados en procesos de Biorremediación de ambientes contaminados con dichos compuestos.

- Dada la estrategia de constante recambio y sustitución de los principios activos de los pesticidas, sería interesante evaluar la capacidad de detoxificación de estos organismos sobre nuevos agentes presentes en el mercado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arrambarri, A., Cabello, M.(1994) *Biodegradación Fúngica en la Contaminación por Hidrocarburos*. Gerencia ambiental. 3: 150-152.
- Cabrera, S.(1982). Eutrophy in Lake. Plant and Soil. 67: 377-387.
- Duarte, G., Rosado, A., Seldyn, L., de Araujo, W.; Dirk, J. (2001). Analysis of Bacterial Community Structure in Sulfurous-Oil-Containing Soils and Detection of Species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (dsz) Genes. Applied and Enviromental Microbiology. 67(3): 1052-1075.
- Ferrer, A. (2003). *Intoxicación por Plaguicidas; Pesticida Poisoning*. ANALES del Sistema Sanitario de Navarra. 26:155-171.
- Gutiérrez, H., Arregui, M.(2000). *Comportamiento de Herbicidas en Suelos, Agua y Plantas*. FAVE. 14 (1): 73-89.
- Haraama, S.(1999) Petroleum Biodegradation in Marine Environments. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1(1): 63-70.
- Hotchkiss, J.(1992) Pesticide Residue Controls to Ensure Food Safety. Critical Rev. Food Sci. Nutrition. 31: 191-203.
- Jiménez, J.(1994) *Normalización de Ensayos de Compuestos Bioactivos, usando Artemia salina como Monitor Biológico*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Venezuela. 16-62.
- Maroni, M., Fait, A.(1993) Health Effects in Men from Long-term Exposure to Pesticides. Toxicology. 78:1-180.
- Nimmo, D., Wilson, A., Blackman, R. (1970). Localization of DDT in the Body Organs of Pink and White Shrimp. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54(4): 333-341.
- Nimmo, D., Robibin, R., Blackman, R. (1972). Effect of DDT on Cations in the Hepatopancreas of Penaeid Shrimp. Trans. Am. Soc. 101(3):547-549.

- Luo, H., Qi, H., Zhang, H. (2004). Assessment of the Bacterial Diversity in Fenvalerate-Treated Soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(5): 509-515.
- Salonius, P. (1972). Effect of DDT and Fenitrothion on Forest Soil Microflora. *J. Econ. Entomol.* 65:1089-1096.
- Senior, E., Balba, M.(1990). Refuse Decomposition. *Microbiology of landfill sites.* CRC Press. 18-57.
- Singh, D. (2002). Microbial Degradation of Insecticides: An Assessment for its use in bioremediation. Elsevier Science B.V. 175-185.
- Varo, I., Navarro, J., Amat, F., Guilhermino, L. (2002) Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potencial of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere.* 48: 563-569.