

105
Riz



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LA BIODEGRADACION Y SU APLICACION
PARA LA BIORREMEDIACION DEL
MEDIO AMBIENTE

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
I R M A R U I Z S I L V A



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS

COMPLETA

JURADO ASIGNADO

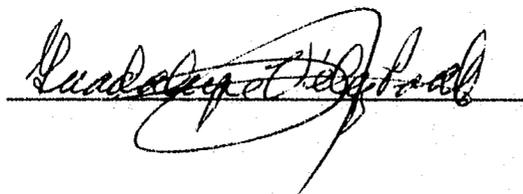
Presidente: Q.F.B. Guadalupe Vélez Pratt.
Vocal: Q. Lilia Vierna García.
Secretario: Q.F.B. Beatríz Luna Millán.
1^{er} Suplente: Q.F.B. María Elsa Escudero García.
2^{do} Suplente: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

BIBLIOTECAS DEL CAMPUS UNIVERSITARIO Y DE OTRAS
INSTITUCIONES

ASESOR DEL TEMA

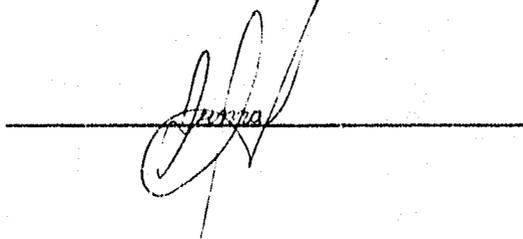
Q.F.B. GUADALUPE VELEZ PRATT



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Guadalupe Vélez Pratt', is written over a horizontal line.

SUSTENTANTE

IRMA RUIZ SILVA



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Irma Ruiz Silva', is written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por iluminar mi vida tanto en los momentos felices como en los tristes y por enseñarme que nunca estaré sola si tú estás a mi lado. Te doy las gracias infinitamente por todo lo que me has dado y sobre todo, por la maravillosa familia que tengo, y que siempre sabré valorar.

A MIS PADRES JESUS Y Ma. DE JESUS

Con todo mi amor y gratitud por su apoyo incondicional, por sus palabras siempre llenas de amor y de aliento, por su gran dedicación y por enseñarme con su ejemplo que la vida es siempre un reto que debemos afrontar con valor y esperanza. Gracias por su amor y paciencia, siempre los querré.

A MIS HERMANOS ANA Y JOSE ANTONIO

Gracias por ser como son y por formar parte de mi vida. Ustedes son de las hermosas personas que Dios me ha permitido conocer en la vida y espero que siempre estemos unidos y nos sigamos apoyando en nuestras carreras. Los quiero mucho.

A MIS ABUELTOS Y TIOS

Les agradezco de todo corazón el haberme ayudado siempre y darme su cariño y sus consejos que siempre llevaré en mi corazón. Gracias por su cariño y por estar siempre conmigo.

DEDICATORIAS

Uno de los mayores tesoros que Dios nos ha dado son los amigos que hacen nuestra vida más agradable y llevadera. Es un verdadero privilegio el poder contar con amigos tan especiales como los que tengo. A ellos dedico con gran cariño este trabajo:

Lorena Vilchis, Lupita Quintana, Sofía Gutiérrez, Elsa Tapia, Pily Villegas, Mercedes Ygotoku, Ana Lilia Ruiz, Alejandra Ramírez, Ma. Elena Cabrera,

Javier Araiza, Inés Vázquez, Mari Paz Flores, Martha Hecht, Pablo Campos, Fabiola Ramos, José Mojica, Elisa Sanchez, Graciela Alvarado, Griselda Monroy, Manuel Flores, Rocío Mejía, Francisco Miranda, Alicia Luna y Alicia Cereno.

A LA MAESTRA LUPITA VELEZ

Con gran cariño, admiración y respeto. Porque siempre que la necesité estuvo conmigo, por su paciencia, por ser extraordinaria como persona y como profesora y por permitirme realizar éste trabajo bajo su dirección.

A MIS PROFESORES

Ya que gran parte de mi formación como Profesionista y como Persona se le debo a ustedes. Gracias por su apoyo. Especialmente y con cariño y admiración a Catalina Cirigo, Julio Angeles, Alejandro Bonifaz y Leonila De la O.

A la Familia Ambríz Ruiz y en especial a Patty por su cariño y amistad de tantos años.

A mis sinodales la Maestra Beatríz Luna y la Maestra Lilia Vierna por su tiempo y dedicación para la revisión del presente trabajo.

A LA UNIVERSIDAD Y A MI QUERIDA FACULTAD DE QUIMICA

Un verdadero hombre decía:
Estoy aquí pero no tengo porqué permanecer en la cuneta.
Tengo el deber de cambiar lo que es malo
o intolerable en mi vida.
Me ha sido dada la facultad de elegir mi camino y lo elegiré.
Hacer menos significa degradarme por mi propia voluntad.

Taylor Caldwell, "Responde como un hombre", 1989.

INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS.....	VI
I.- INTRODUCCION.....	1
II.- GENERALIDADES.....	3
II-1 El suelo y el agua como un habitat microbiano.....	7
II-1.1 Ciclos Biogeoquímicos.....	10
II-1.1.1 Ciclo del Carbono.....	11
II-1.1.2 Ciclo del Nitrógeno.....	15
II-1.1.3 Ciclo del Azufre.....	22
II-1.1.4 Ciclo del Fósforo.....	26
III.- LA CONTAMINACION DEL MEDIO AMBIENTE Y EL PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS.....	29
III-1 Los procesos biológicos y la depuración.....	29
III-1.1 Consideraciones ambientales.....	32
III-2 Mecanismos de biodegradación.....	34
III-2.1 Reacciones comunes en xenobióticos.....	39
III-2.2 Humificación y polimerización.....	50
III-2.3 Acumulación/estabilización mediada biológicamente.....	51
III-2.4 Transformaciones abióticas.....	52
III-2.5 Factores que afectan la biodegradación.....	53
III-3 La biotecnología en la biorremediación.....	55
III-3.1 Generalidades.....	55
III-3.2 Mecanismos de biorremediación.....	57
III-3.3 Tratamientos de aguas y efluentes.....	66
III-3.4 Tratamiento de suelos.....	68
III-3.5 Tratamiento de emisiones gaseosas.....	69

IV-PROCESOS DE BIODEGRADACION Y

MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS.....	71
IV-1 Biodegradación de compuestos naturales.....	73
IV-1.1 Biodegradación de la celulosa.....	82
IV-1.2 Biodegradación de la lignina.....	84
IV-1.3 Biodegradación del petróleo y carbón mineral.....	87
IV-1.3.1 Desulfuración microbiana de los combustibles fósiles...	93
IV-1.3.1.1 Mecanismo de desulfuración.....	94
IV-3.1.2 Metabolismo de hidrocarburos aromáticos.....	95
IV-2 Biodegradación de Compuestos sintéticos.....	98
IV-2.1 Xenobióticos.....	103
IV-2.1.1 Xenobióticos orgánicos.....	103
IV-2.1.2 Combustibles fósiles.....	103
IV-2.1.3 Xenobióticos inorgánicos.....	104
IV-2.1.4 Interacción de los xenobióticos con el suelo.....	104
IV-2.1.5 Factores ambientales que afectan las interacciones entre microorganismos y xenobióticos.....	105
IV-2.1.6 Plaguicidas.....	107
IV-2.1.6.1 Consideraciones generales.....	108
IV-2.1.7 Detergentes.....	111
IV-3 Biodegradación de compuestos alifáticos.....	114
IV-3.1 Compuestos alifáticos halogenados.....	114
IV-3.1.1 Acidos alcanicos halogenados.....	115
IV-3.1.2 Dibromo etileno.....	115
IV-3.1.3 Demeton S-metil-sulfóxido.....	115
IV-3.1.4 Dimetilsulfuro.....	116
IV-3.1.5 Tricloroetileno.....	118
IV-3.2 Otros compuestos alifáticos.....	120
IV-3.2.1 Cymoxamil.....	120
IV-4 Biodegradación de Compuestos haloaromáticos.....	121
IV-4.1 Metabolismo de los compuestos haloaromáticos.....	121
IV-4.1.1 Desmetilación.....	121
IV-4.1.2 Deshalogenación.....	123

IV-4.1.2.1 Desplazamiento del halógeno por medio de hidrógeno.....	123
IV-4.1.2.2 Desplazamiento del halógeno por el grupo hidroxilo.....	124
IV-4.1.2.3 Fisión oxigenolítica del enlace halógeno-carbono.....	125
IV-4.1.2.4 Eliminación del halógeno a través de la formación de intermediarios no-aromáticos.....	125
IV-4.1.3 Ruptura del anillo.....	129
IV-4.2 Degradación microbiana de compuestos particulares.....	130
IV-4.2.1 Cloroanilinas.....	130
IV-4.2.2 Clorocatecol.....	131
IV-4.2.3 Clorobenzoatos.....	133
IV-4.2.4 4-Clorofenilacetato.....	133
IV-4.2.5 Clorofenoxiacetatos.....	136
IV-4.2.6 Clorotolueno.....	137
IV-4.2.7 Dicamba.....	137
IV-4.2.8 Diclorobenceno.....	139
IV-4.2.9 Dicryl.....	140
IV-4.2.10 Pentaclorofenol.....	141
IV-5 Biodegradación de compuestos nitroaromáticos.....	143
IV-5.1 Metabolismo microbiano del grupo nitro.....	144
IV-5.2 Degradación microbiana de compuestos particulares.....	144
IV-5.2.1 Cloronitrofenol.....	144
IV-5.2.2 Nitrobenceno.....	147
IV-5.2.3 Nitrofenol.....	147
IV-5.2.4 Nitroanilinas.....	147
IV-5.2.5 Nitrobenzoatos.....	147
IV-5.2.6 2,4,6-Trinitrotolueno.....	149
IV-5.2.7 Nitrilos.....	151
IV-5.2.8 Nitrosaminas.....	152
IV-6 Biodegradación de compuestos n-alquilados.....	154
IV-6.1 Compuestos particulares.....	154
IV-6.1.1 Etoxilatos de alquilfenol.....	154

IV-6.2.2 Estireno.....	154
IV-6.2.3 Ibuprofeno.....	156
IV-6.2.4 Sulfonatos de alquilbenceno.....	157
IV-6.2.5 Tolueno.....	159
IV-6.2.6 Xileno.....	160
IV-7 Biodegradación de ácidos aromáticos y fenoles.....	162
IV-7.1 Compuestos carboxilados.....	162
IV-7.1.1 Acido benzoico.....	162
IV-7.1.2 Antranilato.....	165
IV-7.2 Compuestos hidroxilados.....	165
IV-7.2.1 Fenol.....	165
IV-7.2.2 Cresol.....	165
IV-7.2.3 Resorcinol.....	165
IV-7.2.4 Hidroxibenzoato.....	166
IV-8 Biodegradación de compuestos heterocíclicos.....	168
IV-8.1 Compuestos particulares.....	168
IV-8.1.1 Atrazina.....	168
IV-8.1.2 BAS.....	169
IV-8.1.3 Carboxina.....	169
IV-8.1.4 Diclorobutazol.....	170
IV-8.1.5 Isouron.....	171
IV-9 Biodegradación de compuestos poliaromáticos.....	172
IV-9.1 Bifenilos policlorados.....	172
IV-9.2 Metabolismo de los PCBs.....	174
IV-9.2.1 Sistemas aerobios.....	174
IV-9.2.2 Sistemas anaerobios.....	175
IV-9.3 Biodegradación de otros derivados de bifenilos.....	177
IV-9.3.1 Metabolismo de bifenilos por hongos y cianobacterias.....	179
IV-9.3.2 P-clorobifenilos.....	179
IV-9.3.3 Biodegradación del DDT.....	180
IV-9.3.4 Fenantreno.....	182
IV-9.3.5 Fluoreno.....	184
IV-10 Compuestos metálicos.....	187

IV-10.1 Biotransformación de metales y compuestos metálicos...	187
V.- LA INGENIERIA GENETICA Y LA BIORREMEDIACION..	199
V-1 Manipulación genética para la construcción de cepas con amplio potencial de biodegradación.....	202
V-2 Efectos resultantes de la liberación de microorganismos modificados genéticamente.....	204
V-2.1 Consecuencias ecológicas de la liberación de microorganismos.....	205
CONCLUSION.....	209
Tablas de Información de Microorganismos empleados en la Biodegradación de Contaminantes.....	210
GLOSARIO.....	219
BIBLIOGRAFIA.....	224

ABREVIATURAS

ABREV.	SIGNIFICADO	ABREV	SIGNIFICADO
A	Amino	GMT	Good Microbiological Techniques
ATA	3-Amino-1,2,4-Triazol	HAA	Acidos alcanoicos Halogenados
BAS	Sulfonatos de Alquilbenceno	LAS	Sulfonatos de Alquilo Lineales
BPB	Bifenilos Polibromados	MBE	Metil Butil Eter
BRS	Bacterias Reductoras de Sulfatos	MCPA	Metoxiclorofenil de alquilo
CB	Clorobenceno	NDBA	Di-n-butilnitrosamina
CBA	Clorobenzoato	NDEA	Di-n-nitrosodietilamina
CNOs	Compuestos Nitrosos	NDMA	Di-n-nitrosodimetilamina
CPH	Clorofenol	NFEs	Etoxilatos de nonilfenol
CSA	Clorosalicilato	NIH	National Institutes of Health
D	Acido Diclorofenoxiacético	NMDA	N-nitrosodimetilamina
DA	Diamino	NOCs	Compuestos n-nitrosos
DBHQ	Dibenzohidroquinona	OHA	Hidroxilamina
DBT	Bibenzotiofeno	OE	Oxido de etileno
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno	PAA	Acido Fenoxiacético
DCB	Diclorobenceno	PAH	Hidrocarburos Poliaromáticos
DCBA	Diclorobenzoato	PCB	Bifenilos policlorados
DCBP	Diclorobifenilo	p-CBs	Para-Clorobifenilos
DDE	1,1-Dicloro-2,2bis (4clorofenol) etano	PCP	Pentaclorofenol
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2bis (4clorofenol) etano	SA	Salicilatos
DMS	Dimetilsulfuro	SDS	Dodecilsulfato de sodio
DNT	Dinitrotolueno	T	Acido Triclorofenoxiacético
DOE	U.S. Department of Energy	TCA	Tricloroetano
EAFs	Etoxilatos de Alquilfenol	TCBP	Triclorobifenilo
EDB	Dibromoetileno	TCE	Tricloroetilo
EPA	U.S. Environmental Protection Agency	TNT	2,4,6-trinitrotolueno
FAVs	Vectores de Aplicación de Campo	TPPS	Tripolifosfato de Sodio
FMN	Flavina Mononucleótido	VOCs	Compuestos Orgánicos Volátiles
GEMs	Microorganismos Modificados con Ingeniería Genética		

I.- INTRODUCCION

Nuestro planeta, la Tierra, ha sido poblado desde hace muchos años por miles de especies de animales, vegetales y microorganismos que viven compartiendo su habitat en el agua o en la tierra. Una de las últimas especies en poblar la Tierra, *Homo sapiens*, se ha logrado desarrollar gracias, en parte, al apoyo que representa la estabilidad de las especies que para su beneficio ha sabido utilizar y al papel de degradación natural que se lleva a cabo en el medio ambiente, debida principalmente a los microorganismos.

Sin embargo, a través de cientos de años de civilización, durante el desarrollo y progreso de gran parte de la raza humana, el equilibrio de su habitat ha sufrido grandes y variados daños. El efecto adverso de muchas de las actividades humanas sobre el medio ambiente se nos presenta como un jinete del Apocalipsis, al que llamamos Contaminación y que pretendemos eliminar o, por lo menos, controlar para impedir la destrucción de nuestro habitat.

La producción y el empleo, a veces desmedido, de compuestos químicos en la industria, anadido a la también desmedida deforestación, han causado desequilibrio entre las especies que forman nuestro ambiente y muchas de ellas indudablemente desaparecerán por ese motivo, aún antes de que podamos siquiera conocerlas.

Dicho desequilibrio se debe a los efectos que causan los compuestos químicos en el medio ambiente, ya que pueden alterar los ciclos de la materia en la biósfera, dañando por consiguiente a las poblaciones.

En la medida en que el hombre trata de aumentar la producción de alimentos para salvarse del hambre, pone en riesgo al medio ambiente, ya que los sistemas empleados para aumentar el rendimiento agropecuario, contaminan y empobrecen los suelos fértiles por el uso de abonos químicos y plaguicidas, así como por el uso de diversos compuestos que directa o indirectamente contaminan el suelo y el agua. Esta contaminación se incrementa por la descarga en ríos, lagos y mares de desechos agrícolas, domésticos e industriales, que acumula en el medio ambiente productos químicos que en muchos casos no se degradan, permaneciendo sin modificarse o sólo una pequeña porción de ellos.

Los productos químicos de uso industrial y agrícola son lixiviados a la tierra, entran a los cuerpos de agua y en ocasiones se transforman en materia húmica o se polimerizan y de esta forma son muy resistentes a ser degradados. Los derrames de petróleo en la tierra y en el mar ya sea accidental o intencionalmente, representan algunos de los ejemplos más dramáticos de contaminación química.

en el medio ambiente productos químicos que en muchos casos no se degradan, permaneciendo sin modificarse o sólo una pequeña porción de ellos.

Los productos químicos de uso industrial y agrícola son lixiviados a la tierra, entran a los cuerpos de agua y en ocasiones se transforman en materia húmica o se polimerizan y de esta forma son muy resistentes a ser degradados. Los derrames de petróleo en la tierra y en el mar ya sea accidental o intencionalmente, representan algunos de los ejemplos más dramáticos de contaminación química.

Ante este panorama, de solución cada vez más apremiante, ha surgido una tecnología que utiliza la propiedad natural de los organismos en el medio ambiente de degradar la materia y de favorecer su reciclaje; a esta propiedad, aplicada a la degradación de compuestos indeseables en un medio determinado, se le ha llamado **biorremediación**.

Un proceso normal para los microorganismos, que es degradar los compuestos en su medio ambiente con el fin principal de obtener carbono y energía para su metabolismo, se ha convertido en un proceso tecnológico para remediar por lo menos en parte la contaminación. Utilizadas concientemente y aplicadas, a veces con una sofisticada tecnología, las notables capacidades degradativas de diversos microorganismos, se convierten en conjunto en los procesos de biorremediación.

La recuperación y mantenimiento del equilibrio ecológico es prioritario no sólo en nuestro país sino en todo el mundo y para llevarlos a cabo eficazmente es necesario el conocimiento cada vez mejor de la fisiología y bioquímica de los microorganismos aptos para una transformación de compuestos en el medio, así como sus relaciones con su habitat.

El objetivo de este trabajo es revisar las capacidades que tienen los microorganismos, especialmente las bacterias, para degradar compuestos recalcitrantes, cuál es su relación con el medio y cuáles son las tecnologías más comunes que se emplean en biorremediación. Al mismo tiempo se pretende con esta revisión, ofrecer un material que puede ser utilizado por los alumnos de licenciatura como conocimiento inicial del tema y como consulta si se quiere profundizar en alguno de los aspectos presentados aquí.

II GENERALIDADES

El que la vida, tal y como la concebimos, sea exclusiva del planeta Tierra, sigue planteando una pregunta sin respuesta. Sin embargo, el hecho de que constituye un medio ambiente excelente en el cual la vida ha evolucionado y se ha desarrollado es evidente por la rica diversidad de los organismos vivos que mantiene.

De todos los organismos vivos los microorganismos son los más versátiles; siendo las primeras formas de vida elemental que se desarrollaron en la Tierra, tardando unos 2 mil millones de años en conseguir evolucionar hacia una forma de reproducción más especializada. Unos 500 millones de años más tarde, aparecieron los primeros microorganismos fotosintéticos y 100 millones de años después las primeras células flotan en las aguas de los turbulentos mares primitivos. Hace 1,100 millones de años se desarrolló en el planeta Tierra una atmósfera a base de una cantidad no despreciable de oxígeno y ello gracias al efecto de los microorganismos capaces de absorber la luz solar para fijar el carbono atmosférico contenido en el anhídrido carbónico, produciendo como residuo de esa actividad fotosintética el preciado y vital oxígeno dando inicio a la aparición de las primeras formas de vida aerobias. El ser humano aparece en la faz de la tierra hace sólo unos dos millones de años [17,40].

En ningún medio ambiente en donde estén presentes los organismos superiores están ausentes los microorganismos y en muchos entornos diferentes y hostiles para los organismos superiores, los microorganismos se encuentran y aún se desarrollan.

Los habitats naturales de los microorganismos son extraordinariamente diversos, cualquier habitat adecuado para el crecimiento de los organismos superiores también permitirá el crecimiento de los microorganismos; pero además, existen muchas condiciones desfavorables para los organismos superiores en las que hay microorganismos, llegando incluso a ser abundantes en estas circunstancias.

Continuamente se están creando nuevos ambientes para los microorganismos; algunos de estos son la consecuencia de procesos naturales como la formación de una nueva isla volcánica o la creación de un lago después de un terremoto; mientras que otros ambientes son

artificiales, provocados por la contaminación de ríos y lagos, la deforestación, el cultivo de plantas exóticas, la introducción de nuevos plaguicidas y fertilizantes y el tratamiento de las aguas negras a gran escala [17].

En las últimas décadas enormes cantidades de compuestos industriales han sido liberados dentro del ecosistema. Un gran número de éstos, particularmente los estructuralmente relacionados con los compuestos naturales, son rápidamente degradados por los microorganismos del suelo y del agua. Sin embargo una porción significativa, principalmente los que poseen estructuras químicas o sustituyentes que normalmente no se encuentran en la naturaleza (xenobióticos), sólo son lentamente catabolizados y tienden a persistir y acumularse.

Ciertos compuestos, particularmente los que exhiben algún grado de toxicidad, contribuyen sustancialmente a la contaminación ambiental. Catástrofes ambientales recientes han revelado el peligro inherente que representa para la sobrevivencia el que este tipo de compuestos sigan permaneciendo en el medio ambiente. Afortunadamente, los microorganismos del agua y del suelo exhiben remarcables mecanismos para degradar un amplio rango de compuestos químicos.

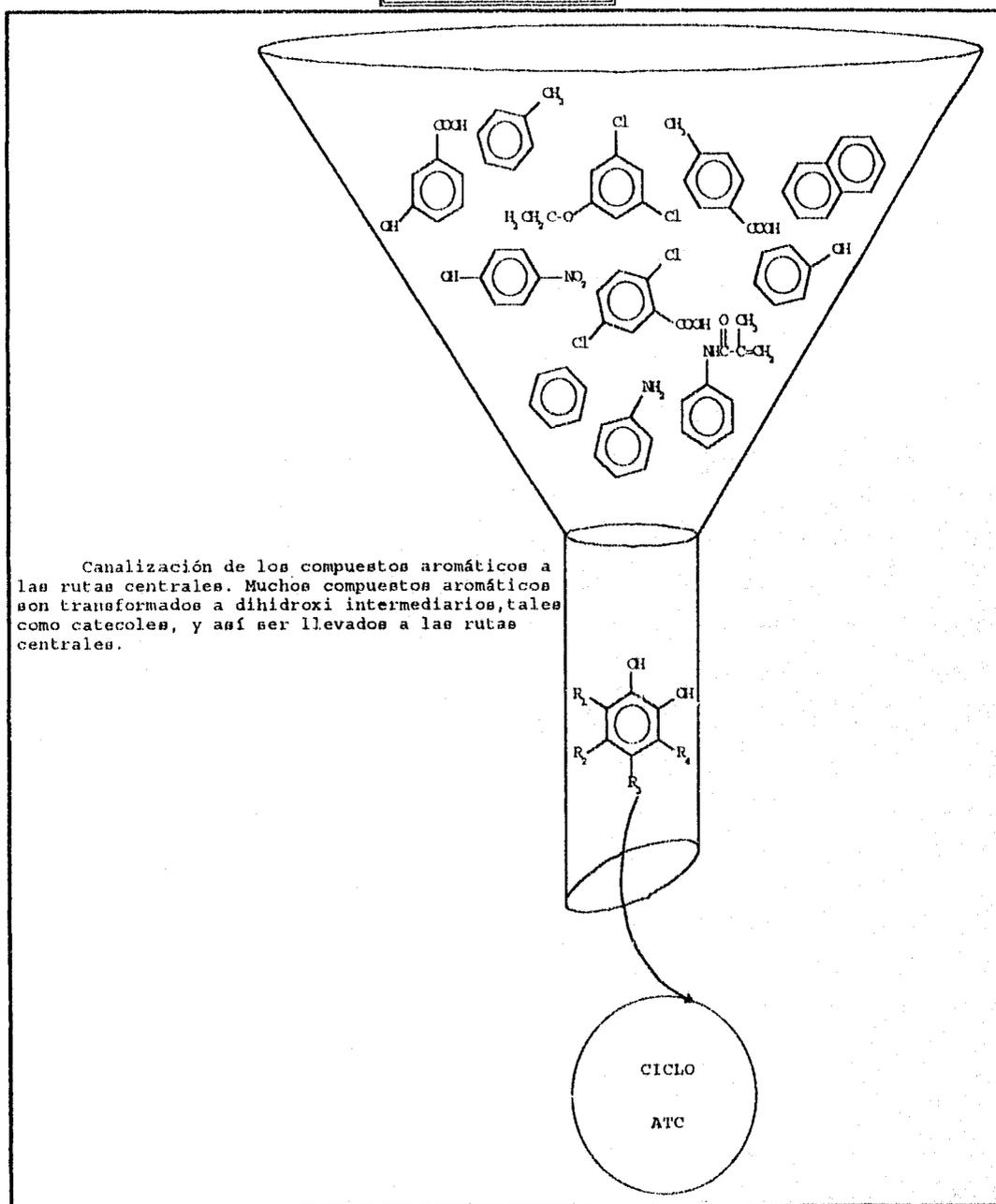
En contraste con las rutas divergentes o rutas biosintéticas en las cuales un gran número de distintas biomoléculas químicas son sintetizadas por un número limitado de intermediarios centrales, las rutas catabólicas son convergentes y una amplia variedad de diferentes sustratos son canalizados a intermediarios y rutas metabólicas centrales. Por ejemplo, las rutas para el catabolismo del anillo aromático converge a compuestos aromáticos hidroxilados, tales como, catecol, protocatecol y gentisato, los cuales entonces son sujetos a dioxigenasas que catalizan principalmente la fisión del anillo para su entrada a ciclo de Krebs {Figura II.1} [138].

Los mecanismos usados por las bacterias para degradar moléculas orgánicas son de interés no sólo por incrementar nuestro entendimiento de los ciclos biogeoquímicos, sino también para explorar el potencial de los microorganismos para degradar moléculas xenobióticas en el medio ambiente abriendo la posibilidad de crear y disponer de nuevos métodos para lograr erradicar dichos compuestos de las áreas contaminadas [137].

La remediación ambiental, específicamente la limpieza de suelos contaminados y diversos cuerpos de agua, es uno de los problemas técnicos y sociales que se nos presenta

actualmente. Las tecnologías que se han utilizado para el tratamiento se han ajustado a tratamientos físicos, químicos, destrucción térmica, procesos de fijación-estabilización y biológicos (biorremediación) [30].

FIGURA II.1



En la biorremediación se hace uso de las capacidades degradativas microbianas para la eliminación o transformación de los compuestos xenobióticos. Por décadas se ha hecho uso de los procesos microbiológicos para la destrucción de los desechos industriales y municipales, pero sólo hasta hace una década los científicos e ingenieros han examinado seriamente el uso de los microorganismos para tratar los derrames químicos atrapados en suelos y mantos acuíferos. Para esto, se hace uso de la estimulación de los microorganismos autóctonos a través del suministro de nutrientes esenciales, pero también se ha recurrido al uso de microorganismos modificados con ingeniería genética (GEMs) y así acelerar y lograr la erradicación del compuesto recalcitrante [19].

El uso de los GEMs ha sido de gran ayuda, ya que gracias a la implantación de plásmidos con diversas capacidades degradativas, compuestos como los bifenilos policlorados (PCBs), pueden ser degradados con relativa facilidad.

El hecho de liberar GEMs en el medio ambiente, nos lleva a la creación de otro tipo de dificultad que requiere nuestra atención, ya que al querer remediar un problema, se puede crear uno aún mayor, debido a que en muchos casos no se sabe el impacto que se causará con la liberación de tales microorganismos dentro del medio ambiente. Entre varios factores, el de mayor interés es la capacidad de transferencia de plásmidos entre microorganismos en la naturaleza. Por lo anterior, se ha recurrido a diversas acciones para legislar la liberación de microorganismos dentro del medio ambiente y minimizar el riesgo de infección así como el daño a la naturaleza que involucrarían los GEMs [47].

II.1 EL SUELO Y EL AGUA COMO UN HABITAT MICROBIANO

El suelo es uno de los sitios más dinámicos por las interacciones biológicas que se llevan a cabo; sirve como medio de cultivo para vegetales y como habitat para la fauna. Adicionalmente, el suelo sirve como receptáculo de una multitud de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos liberados por el hombre (ya sea accidentalmente o intencionalmente como en el caso de los agroquímicos), y de este modo el suelo tiene un papel principal en la determinación de la calidad de nuestro medio ambiente.

El suelo está formado por tres fases, una fase sólida y dos fases fluctuantes que son la acuosa y la gaseosa. La fase sólida está formada por a) minerales inorgánicos, b) residuos de plantas, animales y microorganismos en varios grados de putrefacción y c) microbiota viva y metabolizante [17].

La cantidad de los constituyentes de las tres fases no es la misma en todos los suelos, sino que varía con la localidad. La cantidad de materia orgánica y mineral, que forma parte de la porción inanimada es relativamente fija en un lugar determinado; sin embargo, la porción de agua y aire varía representando juntos la mitad del volumen del suelo; dicho volumen se denomina espacio poroso. La fracción mineral contribuye con poco menos de la mitad del volumen, originándose por la desintegración y descomposición de las rocas, modificándose con el transcurso del tiempo.

La porción inorgánica tiene un notable efecto sobre los habitantes microbianos, debido a su influencia sobre la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. En esta fracción existen diversas partículas que se clasifican según su tamaño:

- > 2mm.- piedras y grava
- 0.05-2.0mm.- partículas de arena
- 0.002-0.05.- limo
- <0.002 (2 μ).- partículas de arcilla.

La materia orgánica constituye del 3-6% del volumen total mientras que la porción viviente sólo ocupa <1%; aún así, esta porción es esencial para la fertilidad del suelo. A

menudo a esta porción se le denomina humus, es un producto de la actividad de síntesis y descomposición de la microflora. El humus es a su vez un producto del metabolismo microbiano y una fuente de alimentos el cual existe en una fase dinámica que continuamente es degradado y reconstituido por los habitantes del suelo a partir de los residuos [86].

La proporción y propiedades fisicoquímicas de estas tres fases influyen fuertemente el crecimiento, la actividad y dinamismo de los microorganismos en el suelo y también modifica el efecto de los xenobióticos en la comunidad microbiana.

La biota del suelo consiste de habitantes macro y microscópicos que interaccionan como una comunidad biológica distintiva. Los habitantes microscópicos incluyen bacterias, hongos, algas y protozoarios y las comunidades macroscópicas incluyen nemátodos, artrópodos y gasterópodos principalmente [62].

Debido a que el tamaño de los microorganismos es muy pequeño y no se pueden ver a simple vista, su presencia en un medio ambiente frecuentemente pasa inadvertido; sin embargo, la función microbiana es de una importancia considerable para la función de todo ecosistema [17].

Los microorganismos obtienen muchos de sus nutrientes de la proporción inanimada del suelo. Algunas especies obtienen el carbono o nitrógeno de la atmósfera en forma de CO_2 , CH_4 o N_2 , pero la mayor parte de estos dos elementos, así como el resto de los nutrientes microbianos se obtienen de la fase líquida del suelo [86].

Los microorganismos en el suelo intervienen en la mineralización de la materia orgánica, la fijación del nitrógeno, hidrolizan muchos compuestos como la celulosa, las pectinas y algunos llegan a degradar la lignina.

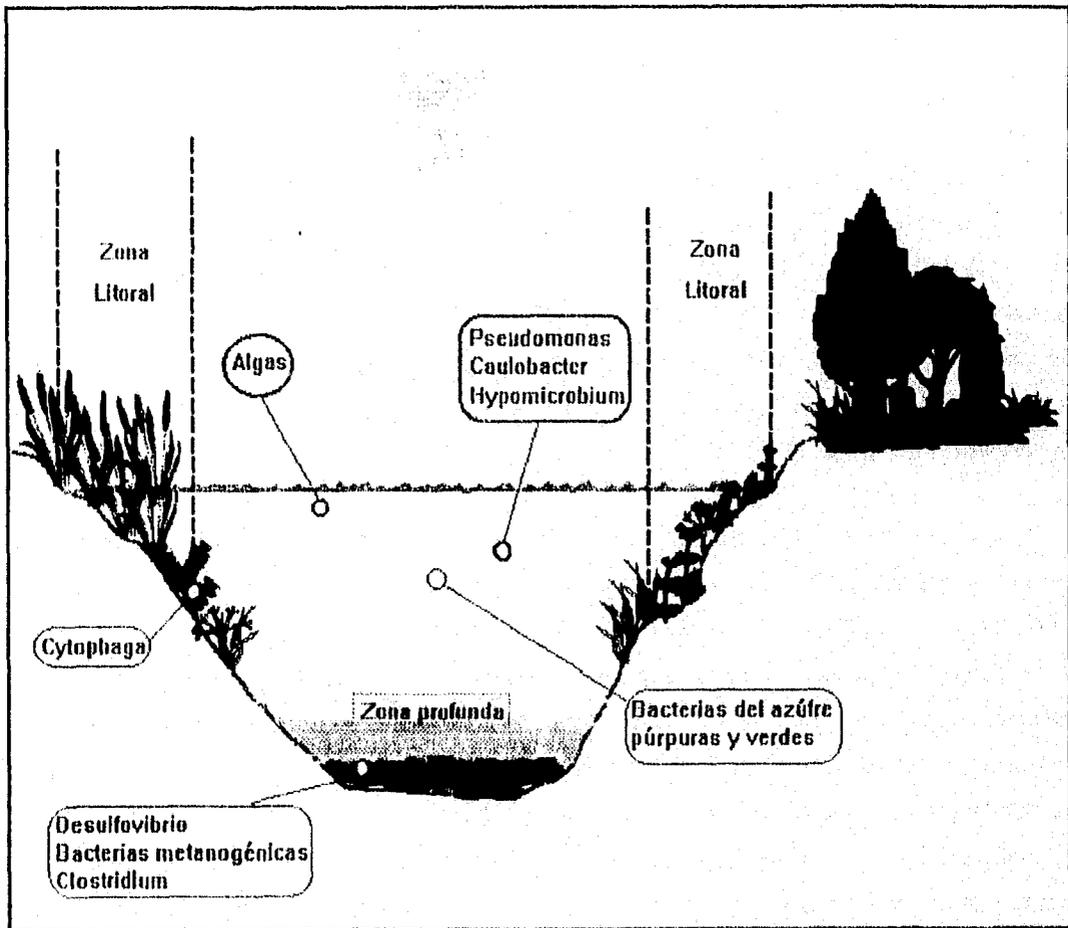
En el agua, particularmente en aguas con bajas concentraciones de nutrientes, los microorganismos tienden a crecer en superficies estacionarias y sobre partículas de materia. En esta forma, un microorganismo tiene contacto con más nutrientes que si estuvieran suspendidas y flotando libres con la corriente. Muchas bacterias que habitan en el agua tienen apéndices y sistemas de adhesión que las sujetan a varias superficies por ejemplo, las bacterias

pedunculadas como *Caulobacter* e *Hypomicrobium*. Algunas bacterias también tienen vesículas de gas que pueden llenar y vaciar para ajustar su capacidad de flotación.

El agua contaminada por afluencia de sistemas de desecho o de residuos industriales orgánicos biodegradables tienen cantidades relativamente altas de bacterias. De la misma manera, los estuarios de los océanos tienen altos niveles de nutrientes y aumentan más la cantidad de microorganismos que en otras aguas de líneas costeras

En la figura II.2 se presenta un lago típico o estanque que sirve como un ejemplo para representar las varias zonas y las clases de flora microbiana encontradas en agua dulce [139].

FIGURA II.2



II-1.1 CICLOS BIOGEOQUIMICOS

Los ciclos biogeoquímicos describen el movimiento y conversión de la materia (C,H,O,N,S,P y otros elementos) por medio de actividades químicas dentro de la ecosfera; a través de estas conversiones los elementos penetran en rutas o ciclos característicos entre las actividades bióticas y abióticas de la Tierra. Los ciclos biogeoquímicos incluyen transformaciones físicas tales como disolución, precipitación, volatilización y fijación; también incluyen reacciones químicas que constituyen biotransformaciones y otras reacciones debidas a agentes abióticos.

Todos los organismos vivientes participan en los ciclos biogeoquímicos pero los microorganismos, debido a sus diversas capacidades metabólicas y alta actividad enzimática, juegan un papel principal en estos ciclos [5].

Los microorganismos participantes en los ciclos biogeoquímicos provocan transformaciones de compuestos muy diversos y así es que intervienen en varios ciclos a la vez. Por ejemplo, los microorganismos desulfatizantes reducen los sulfatos a H_2S al oxidar los compuestos de carbono. Los tiobacilos por su parte, oxidan el H_2S para obtener energía a fin de reducir el CO_2 y sintetizar su biomasa. Con ello participa este microorganismo en tres ciclos: el del carbono, el del azufre y el del nitrógeno. Esto es válido también -aunque de forma diferente- para las bacterias proteolíticas, las cuales liberan CO_2 , H_2S y NH_3 al degradar las proteínas, por lo que participan asimismo en los tres ciclos antes mencionados. El ciclo del fósforo o el del hierro están vinculados del mismo modo con los de otros elementos a causa de la actividad microbiana [119].

Los elementos esenciales del crecimiento para el metabolismo bacteriano incluyen al carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y fósforo. Después del carbono, el elemento más importante es el oxígeno, el cual actúa como un aceptor de electrones. El nitrógeno, el azufre y el fósforo, proveen de precursores para la síntesis de biomasa, así como los elementos esenciales como, calcio, potasio, magnesio que son necesarios para el metabolismo. La degradación del carbono a los nutrientes principales en la biomasa es generalmente de 100 partes de carbono por 10 partes de nitrógeno por 1 parte de fósforo (10:1:0.1). Cuando la biomasa es consumida por la siguiente generación de bacterias, el requerimiento puede ser más estricto: 300 partes de carbón por 10 partes de nitrógeno y una parte de fósforo [76,149].

II-1.1.1 Ciclo del Carbono

El ciclo del carbono es un pre-requisito para la evolución de los organismos vivos de una forma simple a una más compleja, que requiere el establecimiento de un flujo continuo de energía a través de la biósfera; esta evolución fue promovida por el oxígeno, el cual provee una atmósfera en la cual el CO_2 es el compuesto de carbono más estable [134,39].

El reservorio más activo del ciclo del carbono es el CO_2 atmosférico (0.32% de la atmósfera o cerca de 700 billones de toneladas de carbono). Las formas inorgánicas solubles del carbono (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- y CO_3^{2-}) que representan 500 billones de toneladas de carbono están directamente en equilibrio con el CO_2 atmosférico.

La biomasa viviente en ambientes terrestres y acuáticos contiene ligeramente menos carbono (450-500 billones tons.) que la atmósfera. La materia muerta, pero no la materia orgánica fósil, como humus y sedimentos orgánicos, contiene 3700 billones de tons. Todo esto puede ser considerado como un reservorio activo del carbono [4].

El oxígeno contenido en las aguas influye considerablemente sobre el ciclo del carbono. Su presencia en forma molecular hace que este ciclo se verifique con la máxima velocidad. Sin embargo, si falta este elemento gaseoso, la degradación de los compuestos de carbono se realiza al menos lentamente, pero puede completarse mediante respiración anaerobia si el medio dispone de oxígeno combinado en forma de nitritos, nitratos o sulfatos. Si las condiciones son desfavorables hasta el extremo de alterar dicho ciclo, se acumulan los productos intermedios que se depositan en los sedimentos. Estos depósitos orgánicos pueden representar enormes cantidades formadas en el curso de las eras geológicas y sufren otras transformaciones; así se han formado los depósitos de petróleo, gas natural, lignito y turba [119].

La actividad humana recientemente ha introducido cambios en el ciclo del carbono. El CO_2 atmosférico, debido a su relativamente pequeña cantidad, se ha visto afectado por las industrias que liberan este gas.

La fijación neta de dióxido de carbono para formar compuestos orgánicos es realizada por organismos autotrófos. Entre estos microorganismos se incluyen organismos fotosintéticos y quimiolitótrofos. Los grupos de organismos más importantes, en términos de su habilidad para convertir el dióxido de carbono a materia orgánica, son las algas, las cianobacterias y las bacterias fotosintéticas verdes y púrpuras. La reacción general de fijación es [4,111]:



La ruta metabólica principal para la fijación fotosintética de CO_2 es el ciclo de Calvin; los microorganismos son también capaces de incorporar CO_2 a través del sistema de la fosfoenol piruvato carboxilasa. En el caso de microorganismos heterótrofos, ocurre un intercambio, pero no una fijación neta, sin embargo, algunos microorganismos quimiolitótrofos usan uno u otro sistema en vez de, o en adición al ciclo de Calvin para la fijación neta de CO_2 . La siguiente reacción es un ejemplo de como algunos heterótrofos fijan CO_2 :



El dióxido de carbono es convertido a carbón orgánico por los productores totales primarios de la comunidad. Estos procesos son realizados predominantemente por organismos fotosintéticos que convierten la energía de la luz a energía química.

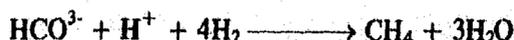
Una porción de la producción primaria es convertida de nuevo a CO_2 por la respiración de los productores primarios. El carbono orgánico restante es la producción primaria neta disponible para los consumidores heterótrofos; los heterótrofos completan el ciclo del carbono, quienes finalmente convierten los compuestos orgánicos formados por los productores primarios de nuevo a CO_2 durante la respiración [4].

Una pequeña cantidad del dióxido de carbono disuelto en el agua puede ser atrapado dentro de bloques de hielo y mantos freáticos o puede formar iones bicarbonato. Los iones bicarbonato reaccionan con iones calcio para formar rocas de calcio (carbonato de calcio); el carbono en esta forma no puede ser regresado a la atmósfera por mucho tiempo. Los carbonatos formados por organismos vivos como conchas u otras estructuras de protección de animales y protozoarios pueden también acumularse en lagos y mares y eventualmente formar

rocas de cal [150]. El carbono depositado en rocas como CaCO_3 es disuelto como iones carbonato en los océanos, también es depositado en formas minerales orgánicas tales como carbón y petróleo [139].

Cuando se queman tales combustibles fósiles o la madera, se producen grandes cantidades de dióxido de carbono que va a parar a la atmósfera. En condiciones de baja cantidad de oxígeno, la combustión es incompleta y produce monóxido de carbono que es un gas tóxico; sin embargo, algunas bacterias (*Pseudomonas carboxidolava* y *P. carboxydohydrogena*) lo pueden metabolizar para formar CO_2 [150, 4].

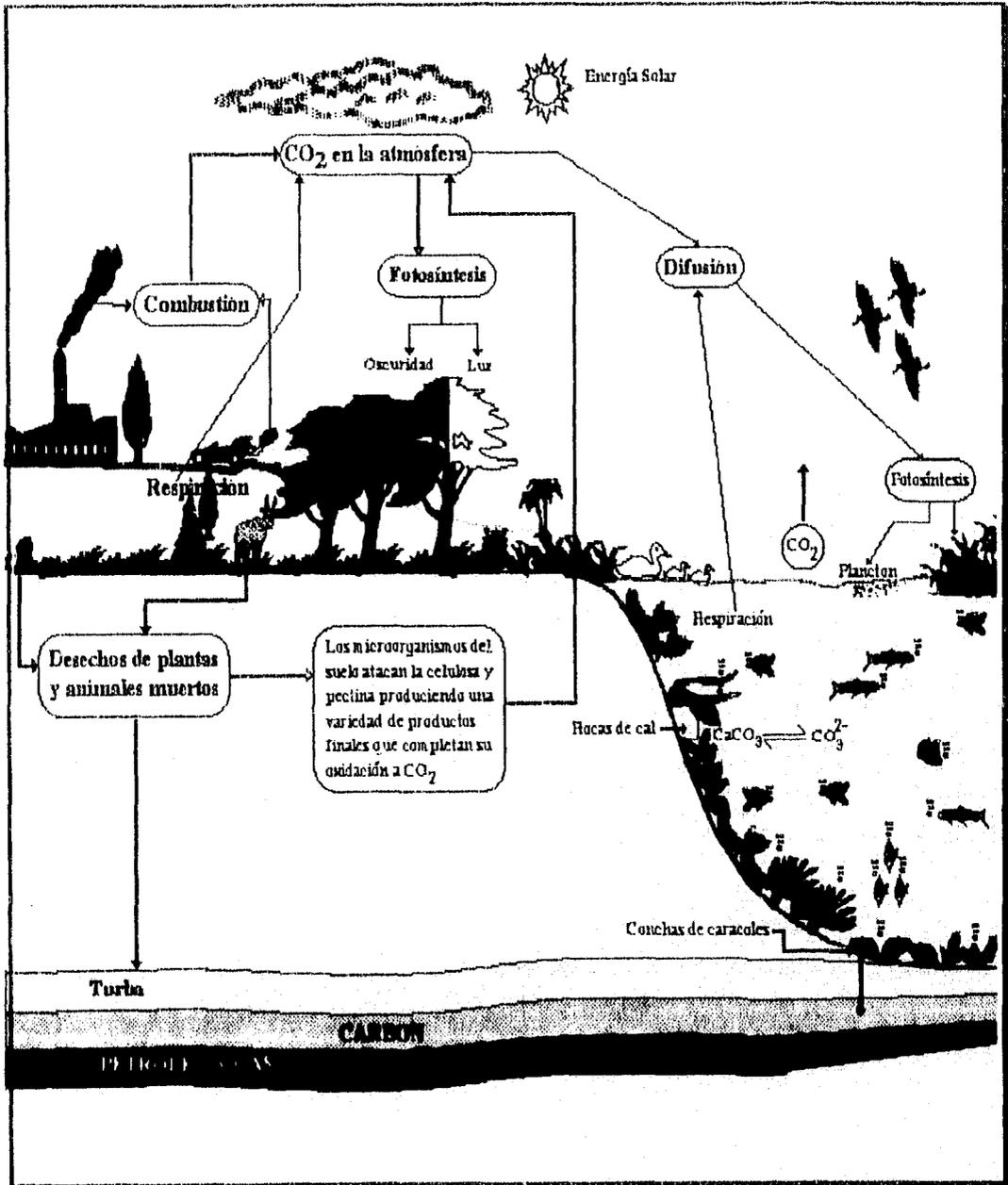
Las arqueobacterias metanogénicas juegan un papel importante en la reducción de CO_2 . Bajo condiciones anaerobias, el dióxido de carbono es reducido a metano (CH_4) por muchos microorganismos. Algunos grupos de arqueobacterias son las responsables de tal transformación. Usan al CO_2 como aceptor de electrones reduciéndolo con el H_2 producido durante los procesos fermentativo, si el CO_2 está disponible en forma de bicarbonato. La reacción puede ser representada así:



La metanogénesis depende de los productos de fermentación realizada por otros microorganismos que utilizan como sustratos. Los hidrocarburos gaseosos como el metano son finalmente reducidos a carbono y no pueden ser más metabolizados sin un apropiado vertedero (aceptor) de electrones [4].

Por último, varios microorganismos que descomponen la materia orgánica, principalmente bacterias, oxidan restos de animales y plantas con la producción adicional de calor y el retorno del dióxido de carbono al medio ambiente {Figura II.3}[150].

FIGURA II.3



II-1.1.2 Ciclo del Nitrógeno

El nitrógeno tiene considerable importancia biológica y ecológica. Es un constructor clave de proteínas, indispensable y a menudo, es elemento limitante en las plantas, animales, y microorganismos además de que gran cantidad de él es usado como fertilizante [62]. El ciclo biogeoquímico del nitrógeno es altamente dependiente de las actividades de los microorganismos [4].

Las reacciones de mineralización, inmovilización y desnitrificación en el ciclo del nitrógeno son llevadas a cabo por numerosas especies microbianas. Estas reacciones son no-específicas y el monitoreo de estos procesos después de la adición de un xenobiótico al suelo no indica cuales especies microbianas son afectadas. En contraste, la nitrificación y la fijación de nitrógeno resulta de la actividad metabólica de grupos microbianos altamente especializados. El ciclo del nitrógeno se describe en la figura II.4 [62, 111, 150, 139].

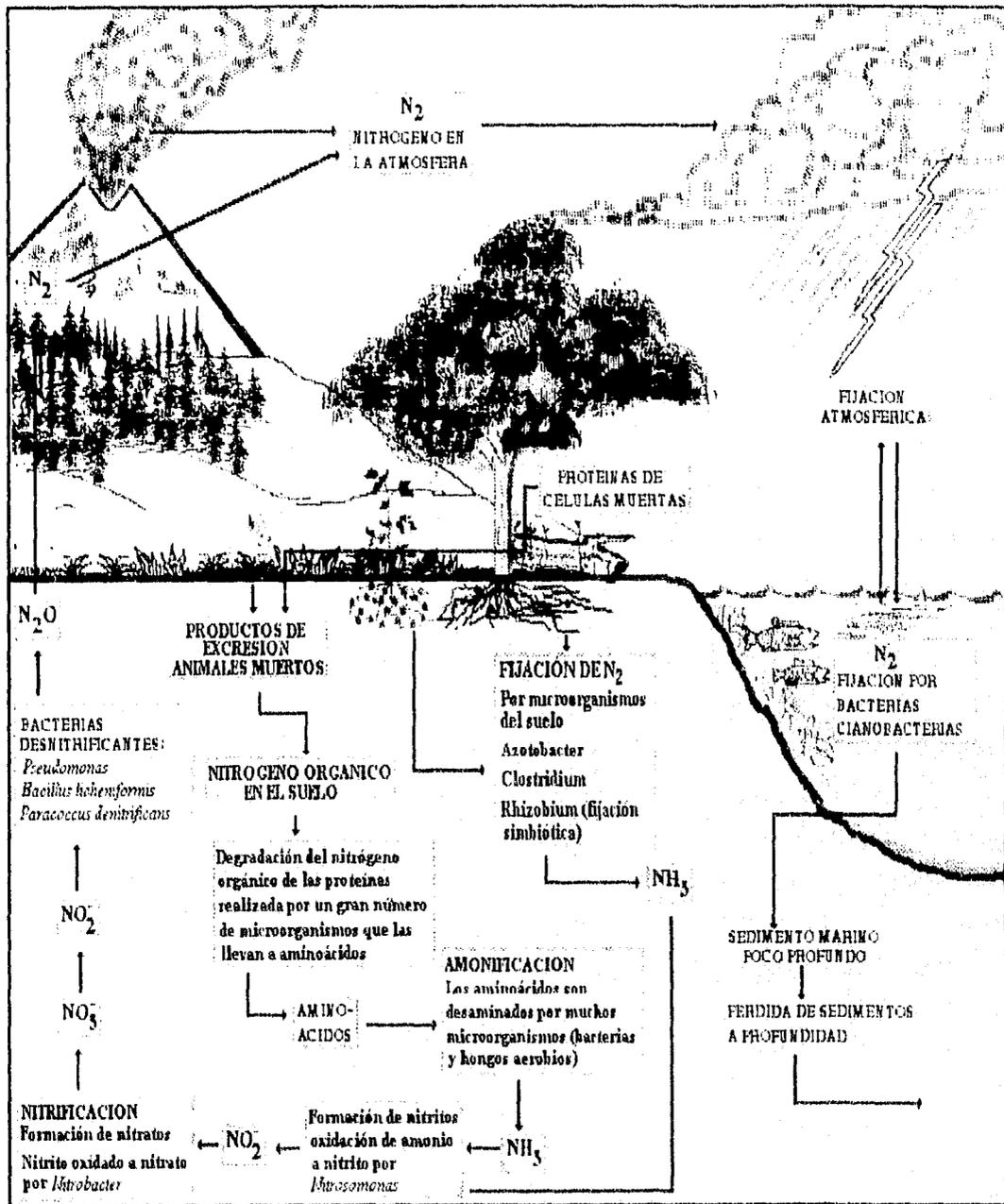
FIJACION DEL NITROGENO MOLECULAR.- Diversas bacterias y cianofíceas son capaces de fijar el nitrógeno en las aguas, lo mismo que en la tierra. Entre las primeras, son importantes las especies *Azotobacter agile* y *A. chroococcum* en medio aerobio, así como las del género *Azotomonas* que son frecuentes en los ríos y lagos. En los sedimentos anaerobios destacan en este sentido la especie *Clostridium pasteurianum* y otras formas próximas a ellas. También las del género *Desulfovibrio*, así como algunas bacterias oligonitrófilas de los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Corynebacterium* también pueden fijar nitrógeno [119].

El amonio es formado como el primer producto detectable de la fijación del nitrógeno:



La fijación biológica de nitrógeno molecular es realizada por diferentes géneros de bacterias de vida libre, algunas de las cuales pueden estar asociadas generalmente en la rizosfera formando asociaciones mutualistas con plantas. La fijación de nitrógeno generalmente

FIGURA II.4



ocurre en respuesta a la baja concentración de amonio. En habitats terrestres, el grado de fijación de nitrógeno por rizobios simbióticos es a menudo de dos o tres órdenes de magnitud más alta que el grado de fijación exhibido por bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Aunque el grado de fijación de nitrógeno en el suelo por bacterias libres es bajo, estas se encuentran ampliamente distribuidas. El grado de fijación de nitrógeno por las bacterias libres, tales como *Azotobacter* y *Azospirillum* es más alto en la zona de la rizósfera que en un suelo carente de raíces. Esto sucede debido a la disponibilidad de compuestos orgánicos de los exudados de las raíces que permite incrementar la eficiencia de la transferencia de nitrógeno a los organismos fotosintéticos.

En habitats acuáticos, cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc*, son los géneros más importantes capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Algunas de estas bacterias forman heterocistos, los cuales separan el oxígeno inhibitorio de la nitrogenasa, del oxígeno involucrado en los fotosistemas. El grado de fijación por cianobacterias, es generalmente uno o dos ordenes de magnitud más alta que por bacterias libres del suelo no fotosintéticas.

La fijación de nitrógeno también ocurre dentro del tracto digestivo de algunos animales, tales como termitas; para estos en organismos que consumen primariamente celulosa, el nitrógeno libre es importante para la formación de proteínas. Substancialmente la fijación del nitrógeno se ha observado en ambientes caracterizados por abundancia de fuentes de carbono y por escasez de nitrógeno, tales como troncos en descomposición o suelos contaminados con petróleo [4].

AMONIFICACION.- Muchas plantas, animales y microorganismos son capaces de realizar la amonificación, este es un proceso en el cual el nitrógeno orgánico es convertido a amoniaco. El nitrógeno en la materia orgánica viva o muerta aparece predominantemente en forma reducida como aminoácidos y aminas. La liberación de amoniaco de un compuesto orgánico nitrogenado simple como la urea, puede ser descrita como en la siguiente ecuación [4]:



La amonificación tiene una importancia especial para el desenvolvimiento de la vida en las aguas puesto que, gracias a este proceso, se está incorporando constantemente amoníaco al ciclo del nitrógeno [119].

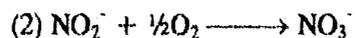
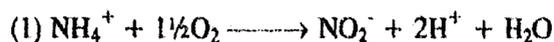
En ambientes acuosos ácidos y neutros el amoníaco existe como ión amonio, parte del amonio producido por amonificación es liberado de ambientes alcalinos a la atmósfera, donde es relativamente inaccesible a los sistemas biológicos. El amoníaco y otras formas del nitrógeno dentro del atmo-ecósfera están sujetos a transformaciones químicas y fotoquímicas y pueden ser regresadas a la lito e hidroecósfera en forma de precipitación.

Los iones amonio pueden ser asimilados por numerosas plantas y microorganismos, que lo incorporan a aminoácidos y otras moléculas nitrogenadas. La incorporación inicial de amoníaco por los organismos es a menudo realizado por reacciones de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa o por aminación directa de un ácido α -ceto carboxílico para formar un amino ácido. La importancia relativa de las dos rutas de asimilación varían entre habitats y depende de los factores ambientales y composición de especies; por ejemplo, a baja concentración de NH_4^+ las bacterias acuáticas utilizan la ruta de síntesis glutamina sintetasa/glutamato sintasa. La incorporación del grupo amino también puede hacerse a través de transaminación.

Los compuestos orgánicos que contienen nitrógeno producidos por un organismo, pueden ser asimilados por otros organismos como fuente de carbono, nitrógeno y energía. La transformación de compuestos nitrogenados no está restringido a los microorganismos, los animales por ejemplo, producen desechos nitrogenados tales como la urea, el ácido úrico la alantoina y el amoníaco del catabolismo de compuestos orgánicos nitrogenados [4].

La amonificación de los nitratos es interesante también en los lagos; representa todo lo contrario de la nitrificación, es decir, la reducción de los nitratos a nitritos y de éstos a amoníaco. Al parecer, para este proceso están capacitadas muchas menos bacterias que para la desnitrificación; por ejemplo, diversas especies de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*, así como algunas cepas de *Escherichia coli*, pueden realizar la amonificación [119].

NITRIFICACION.- Consta de dos etapas, la primera se llama NITRACION y la segunda NITRATAACION [119]. En la nitrificación, el amoniaco o iones amonio son oxidados a iones nitrito y después a iones nitrato [4]:



Los dos pasos de la nitrificación (que son la formación de nitrito y de nitrato) son realizadas por diferentes poblaciones bacterianas; normalmente, los dos procesos están estrechamente acoplados y no ocurre la acumulación de nitritos. La oxidación de amonio a nitrito y la oxidación de nitrito a nitrato son procesos que producen energía para las bacterias nitrificantes (quimioolitótrofas) y utilizan la energía derivada de la nitrificación para asimilar el CO_2 . En la primera reacción (1) el oxígeno molecular es incorporado en la molécula de nitrito. La oxidación del amonio es un un proceso de varios pasos que involucra la generación de hidroxilamina (NH_2OH), esta reacción también produce iones hidrógeno y disminuye el pH de los ambientes en los cuales se lleva a cabo.

Aunque depende de oxígeno, el segundo paso de la nitrificación obtiene el oxígeno de una molécula de agua para la formación de nitrito; el oxígeno molecular sirve como un aceptor de electrones. Ambos pasos del proceso de nitrificación son aeróbicos y produce sólo bajas cantidades de energía.

En el suelo, el género dominante que es capaz de oxidar amonio a nitrito es *Nitrosomonas* y el género que es capaz de oxidar nitrito a nitrato es *Nitrobacter*. Otras bacterias capaces de oxidar amonio a nitrito son los géneros *Nitrospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobus*. En adición a *Nitrobacter*, miembros del género *Nitrospira* y *Nitrococcus* tienen habilidad para oxidar nitritos a nitratos. *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* y *Nitrosococcus* están presentes en ambientes marinos. *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* y *Nitrosolobus* son organismos terrestres.

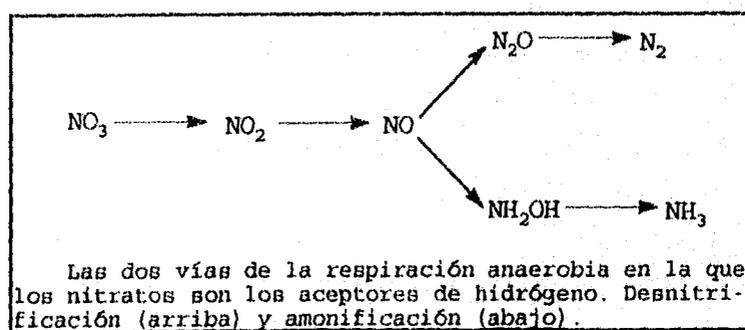
La presencia de nitrito en los mantos freáticos es de un serio interés, ya que el nitrito puede reaccionar químicamente con compuestos amino para formar nitrosaminas, las cuales son altamente carcinogénicas, el nitrato en los mantos freáticos también constituye un peligro para la salud. Mientras que el nitrato por sí mismo no es tóxico, puede ser

microbiológicamente reducido en el tracto gastrointestinal para producir nitrito, altamente tóxico. La acidez normal del estómago en los humanos adultos tiende a prevenir o minimizar tales reducciones, pero los niños con baja acidez estomacal son altamente susceptibles a esta reducción. El nitrito se combina con la hemoglobina de la sangre causando angustia respiratoria, también llamada síndrome del bebé azul. La reducción del nitrato puede tener lugar también en el rumen del ganado, resultando en enfermedad o muerte del animal.

La presencia de ambos aniones en los mantos freáticos representa un problema en las áreas agrícolas que reciben pesadas concentraciones de fertilizantes sintéticos, que por lixiviación contribuyen a dicha contaminación. El uso deliberado de inhibidores de la nitrificación en combinación con amonio puede minimizar el problema de lixiviación de nitrato y al mismo tiempo conducir a una mejor utilización del nitrógeno como fertilizante por la planta [4].

REDUCCION DE NITRATOS Y DENITRIFICACION.- La nitrificación es posible únicamente en presencia de oxígeno (si bien basta una concentración muy baja de este elemento), pero en medio anaerobio -en presencia de donadores orgánicos de hidrógeno- se produce la desnitrificación, esto es, la reducción de los nitratos a nitritos y de éstos a óxidos de nitrógeno (NO, N₂O) y a nitrógeno molecular {figura II.5 } [119]

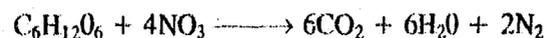
FIGURA II.5



En el suelo, los principales géneros desnitrificantes son *Pseudomonas* y *Alcaligenes*; numerosos géneros adicionales, tales como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas* y *Propionibacterium*, también se han detectado por que desnitrifican bajo las mismas condiciones.

La proporción de los productos de desnitrificación depende de los microorganismos desnitrificantes y de las condiciones ambientales. A bajo pH se forman grandes proporciones de óxido nitroso; en cambio, la formación de nitrógeno molecular se favorece por un adecuado suministro de equivalentes reducidos.

Simultáneamente con la desnitrificación, la materia orgánica es oxidada, la utilización de glucosa mediada por la reducción de nitrato por *Pseudomonas desnitrificans* puede ser descrita por la siguiente ecuación:



Los iones nitrato pueden ser incorporados a la materia orgánica por una variedad de organismos a través de una reducción asimilatoria. Un grupo heterogéneo de microorganismos, incluyendo muchas bacterias, hongos y especies de algas, son capaces de reducir nitrato asimilatoriamente; este proceso de reducción involucra diferentes sistemas enzimáticos, incluyendo nitrato y nitrito reductasas para formar amoniaco, el cual puede posteriormente ser incorporado como amino ácidos.

Ya se dijo que en ausencia de oxígeno los iones nitrato pueden actuar como aceptores de electrones. El proceso es conocido como reducción no asimilatoria de nitrato; durante este proceso, el nitrato es convertido a una variedad de productos mientras la materia orgánica es oxidada. En ausencia de oxígeno, la reducción no asimilatoria de nitrato permite utilizar los compuestos orgánicos con una producción más alta de energía que durante los procesos fermentativos.

Alcaligenes, Escherichia, Aeromonas, Enterobacter, Bacillus, Flavobacterium, Nocardia, Spirillum, Staphylococcus y *Vibrio* son algunas bacterias anaerobias facultativas que reducen nitratos a nitritos bajo condiciones anaerobias.

En los ríos limpios, es decir, no contaminados por aguas residuales, no se producen pérdidas notables de nitrógeno por desnitrificación, debido a que el consumo de oxígeno es mucho menor, incluso debajo de una eventual capa de hielo. Dichas pérdidas son posibles allí únicamente en las zonas como lagos o estanques. Los procesos de nitrificación y desnitrificación pueden cursar también paralelamente en las aguas que contengan abundantes detritus y especialmente en los sedimentos [119].

II-1-1-3 Ciclo del Azufre

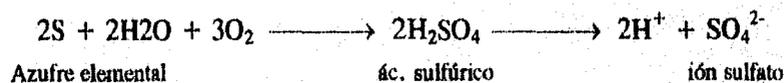
El azufre es un componente esencial de las proteínas y es además requerido por todas las formas de vida. En la naturaleza, el azufre existe en la forma de azufre elemental (S^0) y en diferentes estados de oxidación que incluyen al sulfuro de hidrógeno (H_2S), sulfitos (SO_3^{2-}) y sulfatos (SO_4^{2-}). Los depósitos naturales del azufre elemental son debidos a la acción volcánica y a la actividad microbiana [150].

El azufre es un elemento reactivo con una valencia estable de -2 a +6 en las siguientes formas [4]:

Forma	Ejemplo	Estado de oxidación
S^{2-}	Sulfuros, mercaptanos	-2
S^0	Azufre elemental	0
S_2O_4	Hiposulfito	+2
SO_3^{2-}	Sulfito	+4
SO_4^{2-}	Sulfato	+6

La actividad microbiana que participa en este ciclo es de vital importancia, ya que algunos microorganismos tienen la capacidad para oxidar varios compuestos azufrados mientras que otros lo reducen.

El azufre en forma elemental no puede ser usado por plantas o animales. Sin embargo, algunas bacterias pueden oxidarlo a sulfato (SO_4^{2-}), que es una forma fácilmente disponible para todas las formas de vida. Un ejemplo de tales microorganismos es el autótrofo *Thiobacillus thiooxidans*, el cual lleva a cabo la siguiente reacción:



Algunas especies de *Thiobacillus* como *T. thioparus* y *T. novellus* son acidófilas y quimioautótrofos que realizan dicho proceso bajo condiciones aeróbicas, en el cual se produce ácido, reduciendo el pH de los suelos alcalinos. Estos microorganismos obtienen su energía exclusivamente de la oxidación de azufre inorgánico y fijan el dióxido de carbono. Muchas especies de *Thiobacillus* son aerobios obligados requiriendo de oxígeno molecular para la

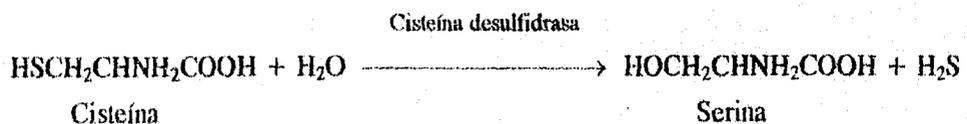
oxidación del azufre inorgánico, sin embargo *Thiobacillus desnitificans* puede utilizar iones nitrato como aceptor final de electrones en la oxidación de azufre inorgánico como se presenta en la siguiente ecuación:



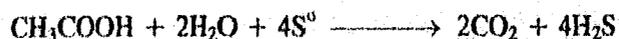
Miembros del género *Sulfolobus*, una arqueobacteria, oxida azufre elemental en habitats calientes y ácidos para generar su energía requerida [111].

sin embargo, las especies del género *Thiobacillus* son las más importantes para oxidar el azufre en las aguas. Esta importancia reside en que pueden oxidar también el azufre en el medio anaerobio de la zona afótica en presencia de nitratos. Los tiobacilos parecen encontrarse en todas las aguas, pero sólo pueden intervenir en el ciclo del azufre cuando está presente el H_2S [119].

Las plantas, algas y muchos microorganismos heterótrofos asimilan azufre en la forma de sulfato, para la incorporación dentro de la estructura de la cisteína, metionina y coenzimas en la forma de grupo sulfidrilo (-SH), el sulfato necesita ser reducido a sulfuro por medio de una reducción asimilatoria de sulfatos. Cuando las plantas mueren, los microorganismos del suelo degradan las proteínas de la planta liberando los amino ácidos y mercaptanos. Estos son además degradados por enzimas llamadas desulfidrasas, como se presenta en la siguiente ecuación en donde el azufre es liberado en forma de sulfuro de hidrógeno [4, 111]:



El azufre elemental puede asumir un papel similar al oxígeno en los procesos respiratorios. La especie *Desulfuromonas acetoxidans* crece en acetato y reduce estequiométricamente en condiciones anaerobias el azufre elemental a H_2S :

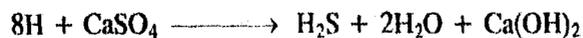


Recientemente, se aislaron de vertientes volcánicas arqueobacterias termófilas cuya temperatura óptima de crecimiento es de 105°C , estas bacterias son capaces de usar azufre e hidrógeno para sus procesos respiratorios. Esta nueva forma de metabolismo quimiolitotrofo puede ser descrito por medio de la siguiente ecuación [4]:



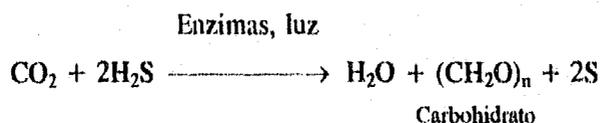
Durante la reducción bacteriana de sulfatos, puede liberarse H_2S al aire, perdiendo así este sustrato, el proceso se llama desulfuración, se trata, por tanto, de un fenómeno paralelo a la desnitrificación, pero los reductores de los sulfatos son casi siempre microorganismos anaerobios estrictos de los cuales el reductor más ampliamente distribuido es *Desulfufovibrio desulfuricans* [119].

El sulfato puede ser reducido a sulfuro de hidrógeno por otros microorganismos. Por ejemplo, la bacteria anaerobia *Desulfotomaculum* puede realizar el proceso según la siguiente ecuación [111]:



Las dos especies anteriores son las bacterias reductoras de sulfatos más comunes. Sin embargo, algunas especies de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Saccharomyces* también liberan sulfuro de hidrógeno a partir de sulfatos, pero estos organismos no parecen jugar un papel principal en la reducción no asimilatoria de sulfatos [4].

Algunas especies de bacterias fototróficas púrpuras y verdes pueden oxidar el sulfuro de hidrógeno que es producido por la reducción de sulfatos y la descomposición anaeróbica de aminoácidos; este proceso de oxidación genera azufre elemental [111]:



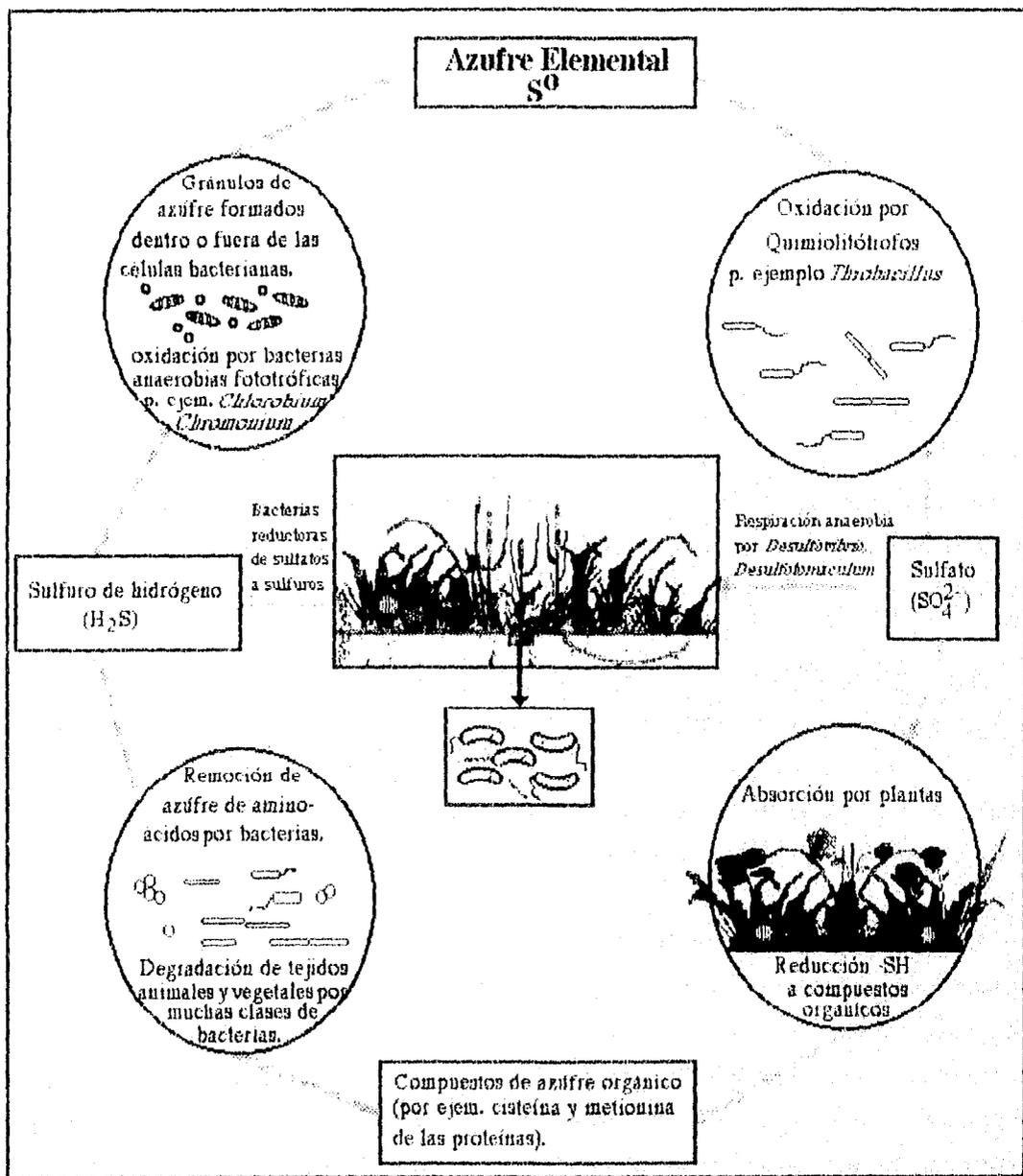
Las bacterias sulfúreas fotosintéticas, que son capaces de fotoreducir CO_2 mientras oxidan H_2S pertenecen a las familias *Chromatiaceae* y *Chlorobiaceae* [4].

En presencia de oxígeno, los compuestos de azufre reducidos son capaces de mantener el metabolismo quimiolitótrofo microbiano, como en los géneros de *Beggiatoa*, *Thiovulum*, *Thiothrix* y *Thermothrix* que son capaces de oxidar H_2S de acuerdo a la siguiente ecuación:



Durante el proceso de oxidación las células depositan partículas de azufre. En ausencia de H_2S estas partículas de azufre son lentamente oxidadas a sulfatos. El ciclo del azufre se representa en la figura II.6 [4,111].

FIGURA II.6



II-1.1.4 Ciclo del Fósforo

El fósforo es esencial para el crecimiento y desarrollo de todas las formas de vida. Sin el fósforo no podrían existir compuestos orgánicos que contienen fósforo tales como la adenosina trifosfato (ATP), ácido desoxiribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA).

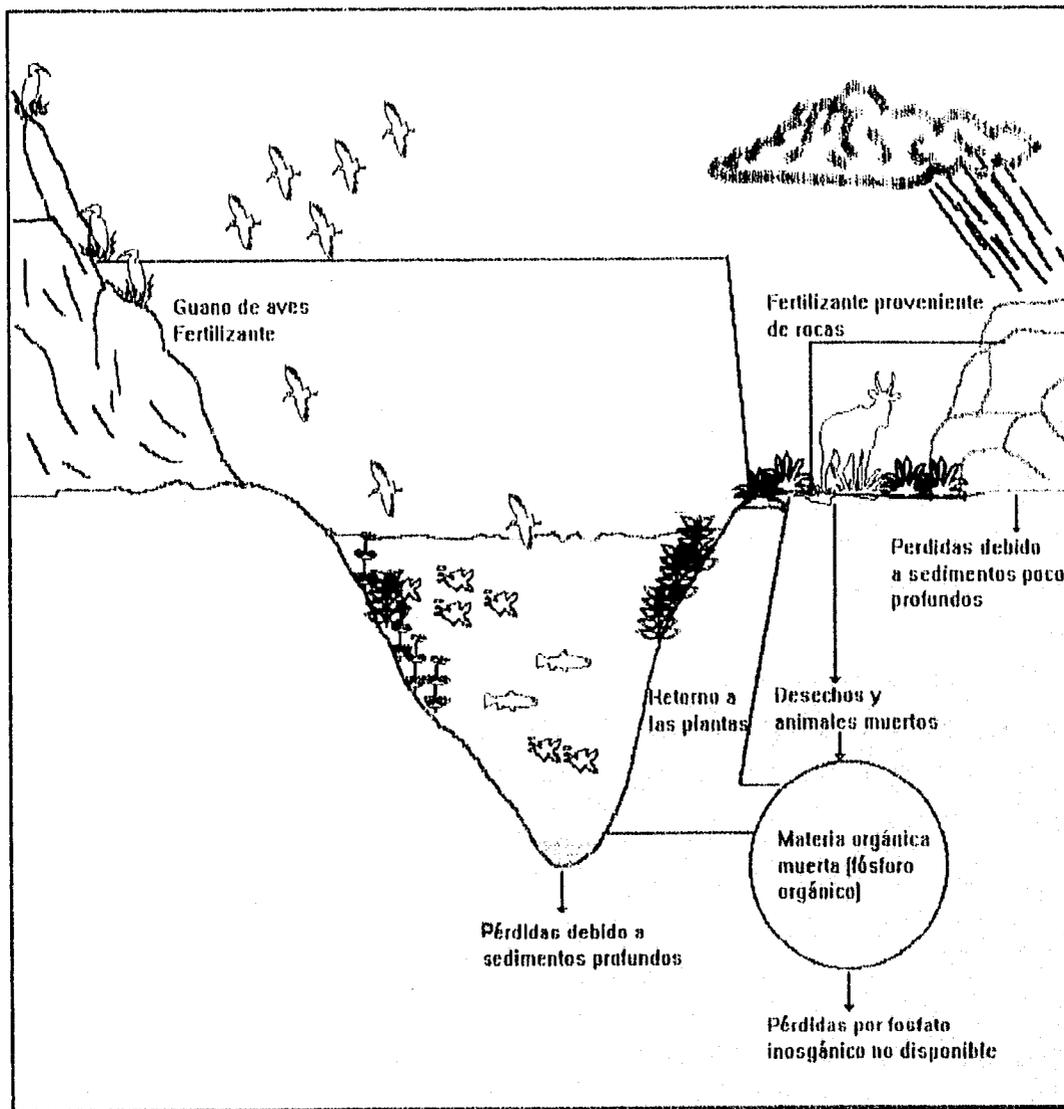
Los organismos adquieren su fósforo en forma de fosfatos inorgánicos (PO_4^{3-}) y lo convierten a fosfatos orgánicos que son importantes en el metabolismo de carbohidratos, grasas y ácidos nucleicos. Los animales inferiores obtienen su fósforo como fosfatos inorgánicos en el agua o como fosfatos orgánicos e inorgánicos en el alimento que consumen. Como en las aguas hay a veces cantidades considerables de fósforo fijado (en forma de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en los huesos) [119,150].

El ciclo de este elemento es de gran importancia debido a la capacidad que tienen muchas bacterias para disolver el fosfato tricálcico. Esto ocurre principalmente durante la producción de ácidos orgánicos. En la descomposición del fósforo participan preferentemente bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Bacillus* y *Micrococcus*, según se ha comprobado en diversos lagos, estanques y reservorios investigados [119].

El fósforo {Figura II.7} tiene importantes reservorios presentes en los sedimentos marinos y acuáticos. Otros reservorios activos pero más pequeños son los fosfatos disueltos en el suelo y agua y los fosfatos presentes en la materia orgánica viva y muerta. Un gran reservorio está presente en las rocas, tales como la apatita ($\text{Ca}_2[\text{PO}_4]_2 \cdot \text{Ca}[\text{FeCl}_2]$), pero éste, se ha dañado debido a la industria de fertilizantes.

Aunque los fosfatos normalmente no son reducidos por la microbiota, parece ser que en algunos suelos y sedimentos ciertos microorganismos tienen la capacidad para utilizarlos como aceptores finales de electrones bajo apropiadas condiciones ambientales. El fosfato comúnmente sirve como aceptor final de electrones en ausencia de sulfatos, nitratos y oxígeno. El producto final de la reducción del fosfato es la fosfina (PH_3). Las fosfinas son volátiles y poseen ignición espontánea cuando tienen contacto con el oxígeno produciendo un resplandor verde.

FIGURA II.7

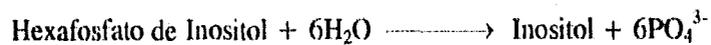


En muchos habitats los fosfatos se combinan con calcio, siendo entonces insolubles y no disponibles para las plantas y muchos microorganismos. Algunos microorganismos heterótrofos son capaces de solubilizar a los fosfatos de estas fuentes, siendo entonces asimilados. El mecanismo de la solubilización del fosfato es normalmente debido a la producción de ácidos orgánicos. Estos microorganismos quimiolitótrofos, tales como

Nitrosomonas y *Thiobacillus*, mobilizan los fosfatos inorgánicos por medio de la producción de ácido nítrico y sulfúrico.

Las formas solubles de los fosfatos inorgánicos pueden ser tomados rápidamente por plantas y microorganismos y son asimilados en forma de fosfatos orgánicos.

El proceso inverso, la mineralización de los fosfatos orgánicos también está presente en el medio ambiente; este proceso es catalizado por fosfatasas que son producidas por muchos microorganismos. Algunas bacterias y hongos producen fitasas, las cuales liberan fosfatos inorgánicos solubles a partir del hexafosfato de inositol (ácido fítico):



Las actividades microbianas pueden también inmovilizar fósforo, haciéndolo inaccesible a la comunidad biológica. La asimilación de fósforo dentro de los constituyentes celulares microbianos, tales como membranas, remueven fosfato del reservorio disponible.

La precipitación de fósforo, especialmente en habitats marinos, limita grandemente la productividad. En los habitats acuáticos, el fósforo puede existir en forma soluble o particulada y estas formas exhiben diferente reactividad y disponibilidad hacia la comunidad biológica [4].

III.- LA CONTAMINACION DEL MEDIO AMBIENTE Y EL PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS

La mayoría de los suelos, ríos y lagos así como de algunas regiones marinas, sufren constantemente de una contaminación intensa, motivada por los desechos y las aguas residuales.

La depuración natural del agua y del suelo tiene una importancia extraordinaria, porque gracias a este proceso los ríos, por ejemplo, vuelven a estar limpios hasta cierto punto, unos kilómetros más allá de los canales de evacuación. Los procesos físicos y químicos (como lo son los fenómenos de sedimentación y oxidación) tienen un importante papel en la autodepuración, pero son los procesos biológicos los que más contribuyen a esta depuración [119]. Los microorganismos constituyen un medio natural para la eliminación de desechos indeseables del medio ambiente [37].

El poder de autodepuración del agua es muy variable. Alcanza su grado máximo donde la agitación provoca la rápida distribución de los residuos y permite un activo intercambio gaseoso con la atmósfera, ya que la descomposición de las impurezas no suele ser posible más que en presencia de oxígeno, por lo que es necesario suministrar éste continuamente. El poder de autodepuración varía también con la estación del año (temperatura, irradiación), ya sea que se trate de aguas de río, lagos o continentales [119].

III-1 LOS PROCESOS BIOLÓGICOS Y LA DEPURACION

Las aves, peces y microorganismos participan activamente en la depuración de las aguas. Las gaviotas y algunos peces ingieren los fragmentos de desperdicio de mayor tamaño, pero en conjunto no pueden utilizar como alimento más que una parte muy escasa de los contaminantes. La importancia de los animales inferiores es algo mayor, sobre todo larvas de insectos, gusanos y protozoos, que consumen fragmentos pequeños y las partículas más

insignificantes; pero el papel más importante corresponde a las bacterias y hongos, porque tienen capacidad para poder degradar tanto los compuestos orgánicos presentes en forma sólida como los disueltos convirtiéndolos en los casos más favorables, a CO₂, agua y sales inorgánicas. Por tanto, en condiciones adecuadas, poseen capacidad para la remineralización completa de muchos contaminantes orgánicos.

Tras la evacuación de las aguas residuales sin depurar en los ríos, suele disminuir el número total de eubacterias existentes en un principio. Después sigue un máximo crecimiento de protozoarios y algas {Figura III.1} [119].

Es bien conocido que los microorganismos son la clave en ciertos procesos bioquímicos; poseen una gran cantidad de enzimas que participan en diversas rutas y mecanismos de control que tienen la habilidad para degradar una gran cantidad de compuestos naturales convirtiendo los compuestos químicos complejos a materiales más simples. En la naturaleza, estos procesos ayudan a limpiar el medio ambiente; por ejemplo, los hongos que actúan sobre los árboles muertos ayudan a degradar las fibras de la madera para alimento. Esto es el caso de compuestos naturales, sin embargo, ciertos xenobióticos presentes en el suelo sólo pueden ser degradados por cepas seleccionadas genéticamente en el laboratorio, las cuales pueden ser obtenidas por:

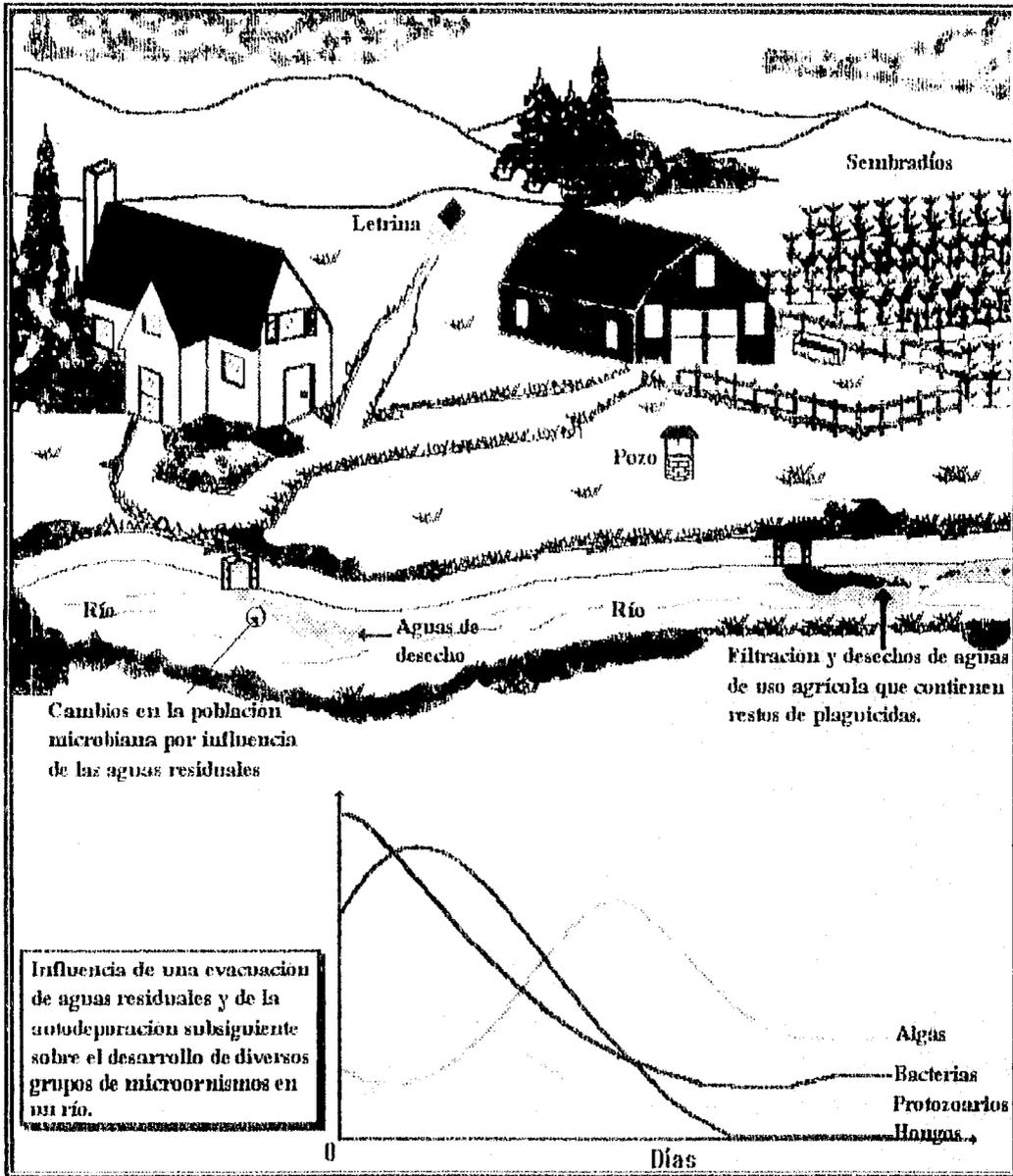
- a) Enriquecimiento natural.
- b) Manipulación genética *in vivo*
- c) Manipulación genética *in vitro*

Los microorganismos participan activamente en el reciclaje del carbono, nitrógeno, azufre y otros elementos en los ecosistemas, al degradar no sólo los compuestos orgánicos naturales, sino también muchos de los sintéticos que son introducidos en la naturaleza a través de los desechos domésticos e industriales del uso exagerado de fertilizantes y plaguicidas.

La comprensión de los procesos hacia los cuales los microorganismos responden al stress contaminante es un punto clave para entender cómo es que funcionan dichos habitats contaminados: cómo es que los contaminantes pueden afectar al medio ambiente de forma negativa y cómo es que los microorganismos responden degradando dichos contaminantes. La investigación en este campo busca aplicar principios similares para convertir los productos

químicos sintetizados por el hombre a compuestos no-tóxicos o menos tóxicos [37,117, 16, 139].

FIGURA III.1



El hongo de la podredumbre blanca, (*Phanerochaete chrysosporium*), se ha empleado y estudiado mucho debido a su capacidad de degradar compuestos xenobióticos recalcitrantes que

incluyen hidrocarburos poliaromáticos y que posee enzimas oxidantes como la ligninasa y peroxidasas dependientes de Mn^{2+} y que catalizan el paso limitante en la degradación de dichos compuestos recalcitrantes [142].

III-1.1 CONSIDERACIONES AMBIENTALES

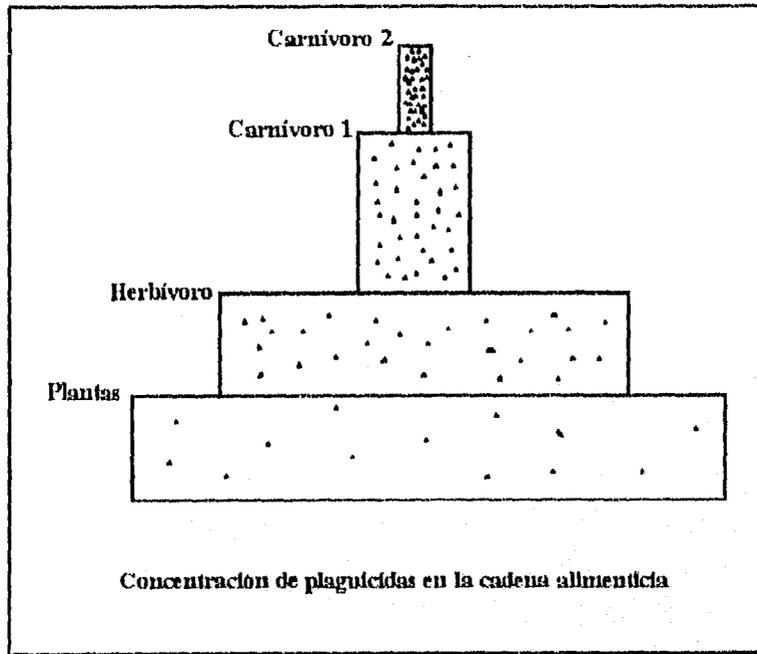
Los plaguicidas se convierten en un problema cuando son dispersados más lejos del área blanco. Las características de no-biodegradabilidad y acumulación de algunos de estos compuestos han enfatizado el problema.

Las condiciones bajo las cuales los plaguicidas pueden convertirse en contaminantes, son la lixiviación y contaminación de los mantos freáticos del suelo tratado; cuando son arrastrados de las superficies agrícolas y áreas urbanas, a causa del mal uso o accidentes, arrastre por corrientes de los plaguicidas y depósitos abandonados de materiales sobrantes y contenedores vacíos. Casi todos los xenobióticos se degradan o transforman en otros productos químicos relacionados y eventualmente, en biomasa. Estos procesos se dan en rangos muy diferentes para los diversos xenobióticos.

En algunos compuestos químicos los cambios ocurren rápidamente (de horas a pocos días), y a estos materiales se les define como de vida corta. En otros, los cambios son muy lentos y los plaguicidas pueden estar presentes por un largo período de tiempo en el medio ambiente, estos son conocidos como plaguicidas persistentes (recalcitrantes). El grado de degradación o descomposición puede variar dependiendo de las condiciones ambientales tales como temperatura, luz solar, aire y localización.

Algunos xenobióticos presentan el efecto acumulación en el cuerpo de los animales (incluyendo al hombre). Estos son llamados xenobióticos acumulativos. Entre estos xenobióticos encontramos algunos plaguicidas que también se acumulan dentro de la cadena alimenticia, como en el caso del DDT {Figura III.2} [11].

FIGURA III.2



III-2 MECANISMOS DE BIODEGRADACION

Antes del siglo XX, la biodegradación natural tuvo la capacidad de mantener la biosfera en un relativo estado de seguridad. Pero entonces el ser humano desarrolló la habilidad para sintetizar industrialmente compuestos químicos nuevos y estos procesos se usaron a gran escala para servir a las necesidades de una población en rápido crecimiento [84].

En la actualidad, más de 1000 nuevos compuestos sintéticos son puestos en venta cada año, estimándose la producción total de compuestos orgánicos en más de 300 toneladas por año. La inquietud pública sobre los posibles efectos que causan los productos químicos en el hombre y en el medio ambiente, se centra en unas pocas clases de compuestos. La EPA, hizo una lista con los principales compuestos contaminantes que incluyen pesticidas, compuestos aromáticos y alifáticos halogenados, nitroaromáticos, bifenilos policlorinados, hidrocarburos policíclicos aromáticos y nitrosaminas [49,64,117].

En la tabla III-2.1 se listan algunos ejemplos de compuestos orgánicos contaminantes que se han detectado en el suelo y cuya presencia representa un peligro para el ecosistema, ya que de algunos de ellos se sabe o se sospecha que carcinogénicos, teratogénicos y/o mutagénicos [62]. Los compuestos más problemáticos en este sentido son los aromáticos con algún grupo halógeno sustituyente (especialmente si el halógeno es el grupo cloro). Los bifenilos policlorados y los clorobencenos presentan su punto de entrada al medio ambiente [119,84].

Los compuestos nitroaromáticos son producidos masivamente en la manufactura de tintes, plásticos y explosivos. Su descarga en aguas de desecho y su aplicación como plaguicidas han ampliado su impacto en el ambiente. A pesar de que muchos de los compuestos que presentan un grupo nitro sustituyente son sintetizados por microorganismos y que por ejemplo, la biodegradación del cloranfenicol genera otros compuestos nitrosustituidos, sigue siendo la industria química la más grande productora de nitroaromáticos [64].

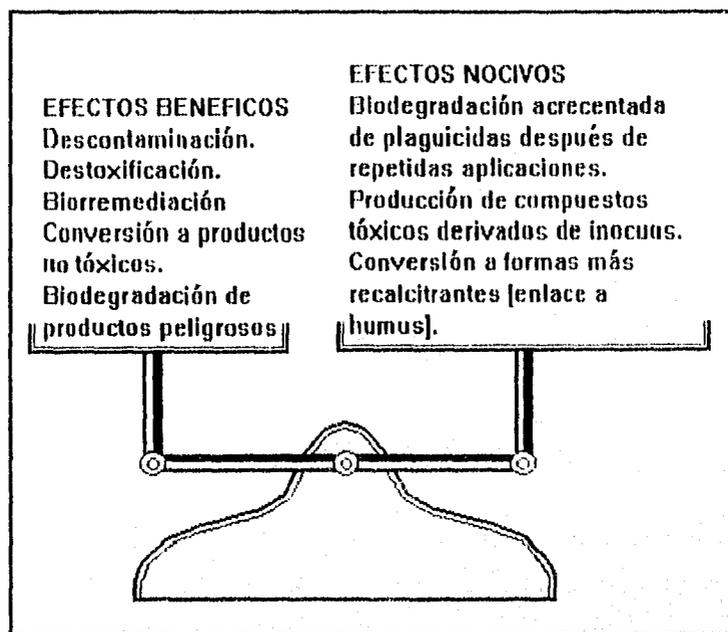
TABLA III-2.1

TIPO DE COMPUESTO	EJEMPLOS	
Alifáticos (halogenados)	Tricloroetano	Cloruro de metileno
	Triclorometano	Tetracloroetano
Alifáticos (no-halogenados)	Acilonitrilo	
Aromáticos (no-halogenados)	Tolueno	Fenol
	Benceno	Cresol
	Nitrobenceno	
Aromáticos (halogenados)	Pentaclorofenol	Hexaclorofenol
	Clorobenzoato	Diclorofenol
Policíclicos (no-halogenados)	Naftaleno	Bifenilo
	Benzo[a]pireno	Fenantraceno
	Antraceno	Benzo[a]antraceno
Policíclicos (halogenados)	Bifenilos policlorinados .	

El problema fundamental que presentan este tipo de compuestos es el ser recalcitrantes. Muchos xenobióticos y compuestos naturales son resistentes a la biodegradación, pero la biotecnología puede proveer soluciones a estos problemas acrecentando su biodegradación y biorremediando el medio ambiente, incluyendo los beneficios y limitantes {Figura III.3}. Algunos xenobióticos son rápidamente degradados (el p-clorofenol tiene una vida media de 3 días) mientras que algunos compuestos naturales como la lignina son extremadamente recalcitrantes [49].

Es muy probable que no haya distinción entre la biodegradación de compuestos xenobióticos y compuestos naturales. En ningún evento, a no ser que la fuente de un compuesto en particular pueda ser rastreada directamente, es extremadamente difícil descubrir hasta que punto la fuente deriva de una natural y hasta que punto fue producido por la industria manufacturera; por ejemplo, el cloruro de metileno, es un compuesto industrialmente importante y ha sido clasificado por la EPA como un contaminante prioritario a pesar de ser un compuesto natural. Una gran variedad de sustancias aromáticas participan en los procesos biogeoquímicos; su biosíntesis y degradación forma una parte importante del ciclo natural del carbono [46,49].

FIGURA III.3



En 1988 los científicos comenzaron a hacer uso de los microorganismos para la limpieza de las aguas tóxicas producidas en varios procesos industriales. Por ejemplo, algunas bacterias pueden actualmente sintetizar algunas enzimas que degradan los compuestos tóxicos a sustancias menos peligrosas [139]. Una gran parte del trabajo en el laboratorio está enfocado en los detalles del metabolismo de compuestos individuales, a menudo se usan colecciones de organismos suministradas con altas concentraciones del sustrato puro. Este trabajo es importante, pero todavía no se puede apreciar su comportamiento en la naturaleza [49].

El grado de destrucción del compuesto contaminante puede fluctuar entre un simple desplazamiento de los átomos o grupos funcionales (biodegradación parcial) a la completa oxidación del compuesto para producir formas inorgánicas de sus átomos constituyentes (p. ejem., CO_2 , H_2O , y sales inorgánicas). Este último proceso (mineralización) resulta en una sucesiva limpieza y sugiere que la destoxificación también ha sido alcanzada [132]. La completa mineralización de un compuesto puede ser un proceso lento que a menudo involucra muchas generaciones y géneros (en co-metabolismo) de organismos. Si el organismo puede crecer aeróbicamente en un xenobiótico como única fuente de energía, sólo aproximadamente

dos terceras partes del carbono puede ser oxidado a CO_2 y el restante es convertido en nuevo material celular. Menos biomasa es producida bajo condiciones anaeróbicas, los productos orgánicos son comúnmente acumulados antes de ser finalmente convertidos en metano [49].

Los procesos microbianos pueden ser determinados en muestras de agua y sedimentos usando técnicas trazadoras y estudios de campo tratando de mantener las condiciones in situ tanto como sea posible, pero en ocasiones es necesario trabajar con microorganismos aislados para ayudar a interpretar los resultados obtenidos con las muestras naturales. Los microorganismos empleados pueden entonces ser manipulados genéticamente para degradar un compuesto en particular y así proponerse para ser utilizados en procesos de biorremediación (principalmente para el tratamiento de mantos freáticos contaminados). De esta forma las herramientas de la biología molecular y la ingeniería genética pueden contribuir sustancialmente al progreso de la biorremediación.

El conocimiento de los mecanismos moleculares del ataque enzimático y de la estructura molecular en la biodegradación de los compuestos químicos sintéticos es esencial para aumentar la capacidad de destoxificación de los biorreactores el problema que de esto resulta está en que muy poco se sabe acerca de la sobrevivencia de tales microorganismos una vez liberados al medio ambiente [87,18].

Muchos compuestos químicos contaminantes potencialmente tóxicos, recalcitrantes o insolubles, escapan a la degradación o perturban los sistemas convencionales de tratamiento. Los procedimientos para el tratamiento biológico son a menudo inadecuados para remover dichos compuestos, ya que el uso de microorganismos para el tratamiento de las aguas de desecho industrial, requiere la extrapolación de los estudios de laboratorio a los sistemas de tratamiento en el medio ambiente (in situ). La extrapolación es imprecisa porque sólo algunos de los parámetros químicos y biológicos del medio que influyen en el potencial de biodegradación de las cepas de laboratorio, pueden ser fijados bajo condiciones de laboratorio en experimentos bien controlados. Un problema mayor es el desarrollar y mantener un microorganismo con capacidad específica para degradar un determinado compuesto químico o el encontrar una cepa autóctona con las características deseadas para el tratamiento [117].

Existen diferentes tecnologías para el tratamiento y destoxificación de los residuos peligrosos, siendo las principales:

A) Tratamiento térmico.- Induce cambios permanentes en los residuos peligrosos; el volúmen final se reduce considerablemente y permite la recuperación de energía, ya que es posible obtener importantes cantidades de vapor a alta presión, a partir de lo cual se puede generar calor o electricidad.

B) Tratamiento biológico.- Utiliza microorganismos desarrollados selectivamente para la degradación de ciertas sustancias tóxicas. De entre los métodos biológicos destacan los que se muestran en la tabla III-2.2:

TABLA III-2.2

TECNOLOGIAS	DESCRIPCION DEL PROCESO O EL EQUIPO	OBSERVACIONES Y TIPO DE RESIDUO
LODOS ACTIVADOS	Es un proceso que utiliza una masa activa de microorganismos (biomasa) que es capaz de descomponer sustancias biodegradables en forma aerobia.	Sólo se utiliza para sustancias biodegradables o que puedan ser bioadsorbibles.
COMPOSTEO [35,12,43,55]	El proceso involucra una oxidación biológica. Se puede llevar a cabo mediante dos métodos: a) en tierra b) en reactores.	Los productos resultantes se pueden utilizar como mejoradores de suelos.
LAGUNAS DE ESTABILIZACION	Proceso parecido al de lodos activados, sólo que se lleva a cabo en forma anaerobia.	Se utiliza para grandes volúmenes.
A) DIGESTORES ANAEROBIOS	Es un proceso en el que se degrada la materia orgánica a metano y dióxido de carbono en un medio carente de oxígeno.	Se utiliza para compuestos como fenol, ácido ftálico, propanol, propilenglicol, etc.
B) BIOCONTACTADORES	El contactador tiene una serie de discos de poliestireno, cloruro de vinilo u otro material similar. Estos discos se sumergen parcialmente en el residuo y entonces se les adhiere una biomasa de 2-4 milímetros de espesor.	Se aplica a residuos orgánicos diluidos.

C) Tratamiento químico.- Se basa en la modificación química de las propiedades de los residuos peligrosos, con lo cual las sustancias se convierten en no-tóxicas y su solubilidad en agua se reduce.

D) Tratamiento físico.- En general, estos procesos separan el residuo por aplicación de fuerzas físicas o cambiando la forma física del mismo. Sus ventajas son: simplicidad, costo relativamente bajo y amplio intervalo de aplicación [31].

II-2.1 REACCIONES COMUNES EN XENOBIOTICOS

Desde hace tiempo se ha reconocido la importancia de las comunidades microbianas del suelo en mediar la degradación de los plaguicidas; de hecho, uno de los primeros plaguicidas orgánicos sintéticos, el 2,4-diclorofenoxiacético, se reconoció la degradación microbiológica como el primer mecanismo de destoxificación en los jardines.

La degradación de plaguicidas a través de procesos metabólicos microbianos es de importancia por ser el primer mecanismo de transformación biológica, ya que los microorganismos pueden proliferar en virtualmente cualquier ambiente imaginable debido a su notable poder de mutación y adaptación y potencial para adquirir capacidades degradativas cuando se exponen a los xenobióticos.

El metabolismo microbiano de los plaguicidas es a menudo subdividido en dos clases principales [115,34]:

CATABOLISMO.- A menudo resulta en la mineralización del compuesto orgánico de alguna porción del mismo vía rutas enzimáticas a productos simples de presencia común y universal (CO_2 , NH_3). En algunos casos, una porción de la molécula puede ser mineralizada y otra porción puede acumularse en el suelo (p.ejem. metabolismo del Carbofuran). Hay que señalar que el catabolismo no debería ser equiparado con la mineralización o la destrucción completa del plaguicida. La clave para entender el catabolismo es que primeramente es un proceso

conducido por el microorganismo con el fin de obtener energía en donde el compuesto orgánico sirve como sustrato para el crecimiento.

COMETABOLISMO.- Muchas enzimas degradativas microbianas (catabólicas) no están directamente ligadas a los procesos que liberan energía para el crecimiento. De este modo, las enzimas que adicionan agua o rompen enlaces químicos por hidrólisis o fisión aldólica, simplemente sirven para la función de suministrar sustratos para las secuencias metabólicas que terminan en la producción de energía. Cuando ocurre una disyunción, sucede la degradación incompleta del xenobiótico con la acumulación de metabolitos. En consecuencia el xenobiótico es transformado por reacciones metabólicas pero no sirve como fuente de energía para el microorganismo.

La transformación cometabólica puede conducir a la acumulación de productos intermediarios con decremento o incremento de su toxicidad y así causar impactos ambientales adversos, y en algunos casos, inhibir el crecimiento microbiano así como su metabolismo. Por ejemplo, el 4-clorotolueno se convierte en 3-cloro-6-metilcatecol que ya no puede ser más metabolizado. Esto sugiere que el catecol inhibe a las enzimas dioxigenasas que son esenciales en las rutas degradativas de las moléculas aromáticas.

Existen además otros procesos involucrados en la transformación microbiana de los xenobióticos:

- 1.-Polimerización o conjugación, en el cual las moléculas del xenobióticos están unidas junto con otros xenobióticos o con compuestos naturales.
- 2.-Acumulación, el xenobiótico es incorporado dentro del microorganismo.
- 3.-Efectos secundarios de la actividad microbiana, en la cual, el xenobiótico es transformado debido a cambios de pH, condiciones redox, productos reactivos, etc.

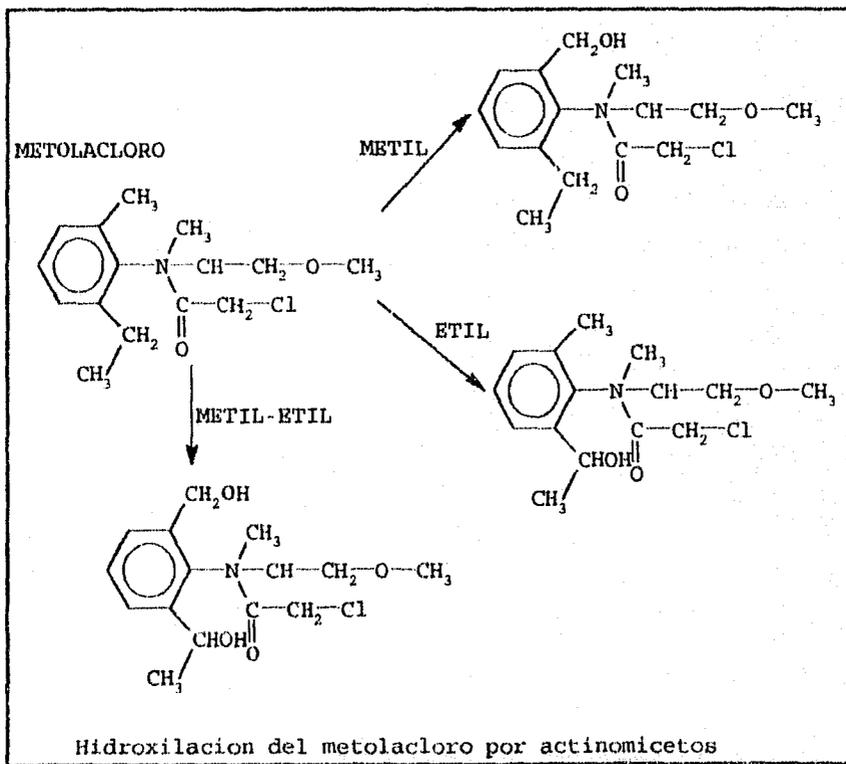
La transformación microbiana de un xenobiótico puede involucrar más de un tipo de mecanismo y bajo diferentes condiciones, varios productos pueden ser derivados del mismo compuesto inicial dependiendo de las condiciones ambientales; parámetros tales como efectos

fotoquímicos, químicos y biológicos que son capaces de causar transformaciones en la estructura química del compuesto [137,34].

Las reacciones más comunes en la degradación microbiana de los xenobióticos se exponen a continuación [99]:

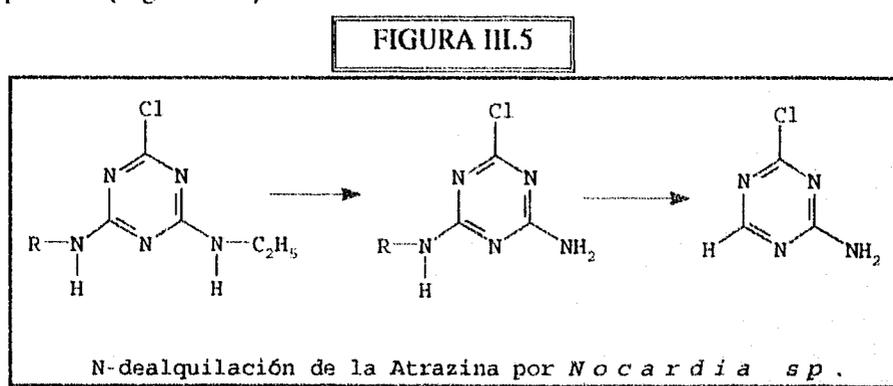
1) **HIDROXILACION.-** La hidroxilación microbiana es a menudo el primer paso en la degradación de plaguicidas. La adición de un grupo hidroxilo en la estructura del xenobiótico le proporciona mayor polaridad y acrecenta su solubilidad en agua haciéndola además más reactiva. Las enzimas que catalizan esta reacción son monooxigenasas, hidrolasas o funciones mixtas de oxidasas. La hidroxilación puede ocurrir en el anillo aromático, o en grupos alifáticos. Para que se lleve a cabo la reacción es necesario la presencia de O₂ y NADPH en ese orden. Por ejemplo, el metabolismo del metolaclor por cepas de actinomicetos lleva a diferentes productos hidroxilados {Figura III.4}

FIGURA III.4

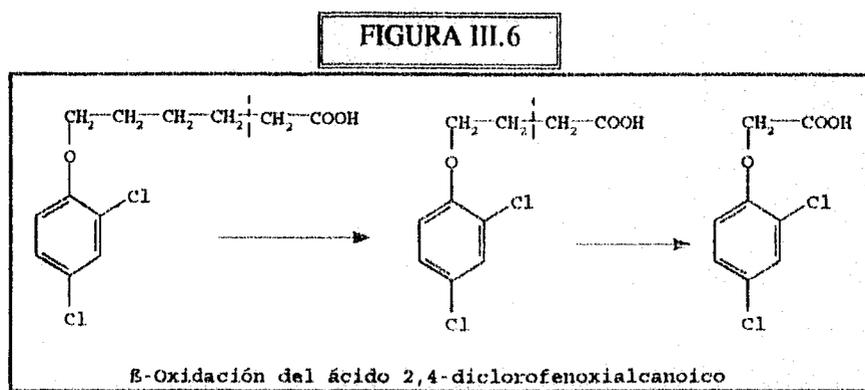


2) **N-DEALQUILACION.**- La N-dealquilación es una importante reacción de detoxificación para fenilureas, acilaminas, carbamatos, S-triazinas, dinitroanilinas, y plaguicidas biperidínicos. Las sustituciones alquílicas en el anillo aromático son a menudo el primer lugar donde los microorganismos inician la transformación catabólica de la molécula de un compuesto xenobiótico.

Las enzimas involucradas representan una mezcla de funciones de oxidasas que requieren un núcleo de nicotinamida reducido como donador de H. Como ejemplo se presenta la ruta principal del metabolismo de la atrazina por un cultivo de *Nocardia* se lleva a cabo por N-dealquilación {Figura III.5}.

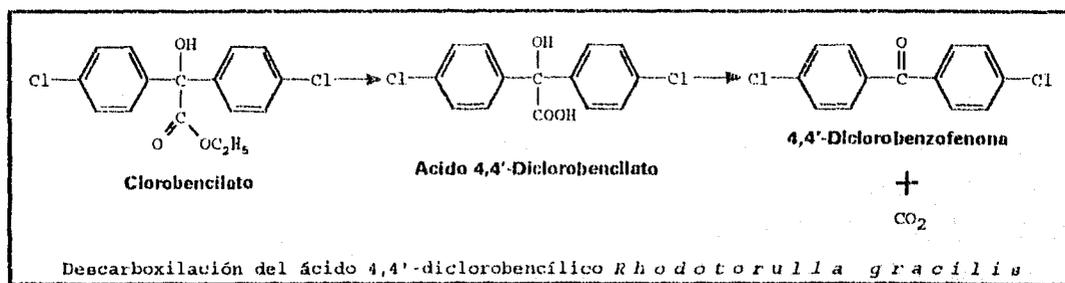


3) **β -OXIDACION.**- Muchos xenobióticos aromáticos, especialmente herbicidas fenoxialcanoicos, poseen cadenas de ácido graso que pueden ser metabolizadas por β -oxidación. Esta reacción procede por la ruptura inicial de un fragmento de dos carbonos; el ácido graso acortado puede ser más degradado de la misma manera. La sustitución en el anillo aromático de un ácido ω -fenoxialcanoico especialmente en la cadena lateral, tiene una fuerte influencia para facilitar la β -oxidación {Figura III.6}.



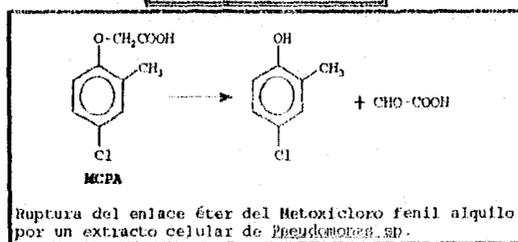
4) **DESCARBOXILACION.**- El desplazamiento del grupo carboxilo por H es otra reacción enzimática común llevada a cabo mediante la actividad microbiana. En el caso de los ácidos carboxílicos aromáticos, el grupo carboxilo puede ser degradado más o menos rápidamente dependiendo de la influencia de la configuración y sustitución en la molécula. La descarboxilación es una reacción microbiológica muy frecuente en la naturaleza, y se han detectado varios ejemplos en el metabolismo de los xenobióticos; como la descarboxilación causada por la microflora del suelo en ácidos benzoicos, bupiridilos de hidrocarburos halogenados con actividad acaricida {Figura III.7}.

FIGURA III.7



5) **RUPTURA DEL ENLACE ÉTER.**- La ruptura del enlace éter en los plaguicidas puede disminuir su toxicidad para los organismos blanco. Tal ruptura, la separación de un hidrocarburo de un átomo de oxígeno que funciona como ligando con la otra porción de la molécula. Aunque el mecanismo específico de esta reacción no es todavía claro, los estudios sugieren que la ruptura es catalizada por oxidasas en presencia de nucleótidos de piridina reducidos y oxígeno molecular. La o-dealquilación también representa una reacción de ruptura del éter en la cual un sólo grupo alquilo es eliminado. Muchos plaguicidas, tales como herbicidas de ácido benzoico, organofosfatos, carbamatos, metoxi-S-triazinas, fenilureas y fenoxialcanoatos, tienen un enlace éter o un grupo alcoxido {Figura III.8}.

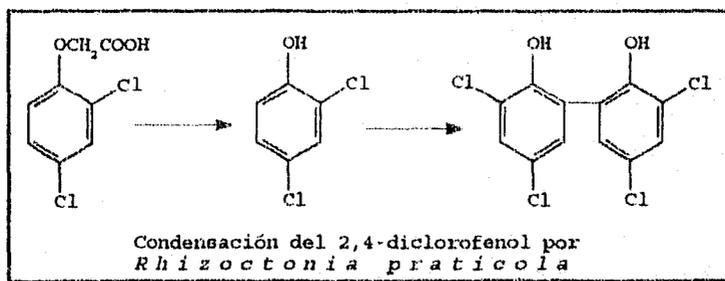
FIGURA III.8



6) **EPOXIDACION.**- La epoxidación o inserción de un átomo de oxígeno dentro de un doble enlace carbono-carbono, frecuentemente resulta en la formación de productos con mayor toxicidad ambiental. Por ejemplo, varios microorganismos pueden catalizar la conversión de ciclodienos clorados como el insecticida aldrín y el heptacloro a sus derivados epóxidos que son tóxicos. Las especies de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *P. notatum* convierten el aldrín al epóxido dieldrin.

7) **ACOPLAMIENTO OXIDATIVO.**- El acoplamiento oxidativo o reacciones de condensación son catalizadas por fenol oxidasas tales como peroxidasas. En la condensación del fenol por ejemplo, los radicales ariloxi o fenolatos se forman al remover un electrón y un protón del grupo hidroxilo. Los radicales fenolatos resultantes se acoplan entonces con fenoles u otros compuestos para producir productos dimerizados o polimerizados. Estos procesos que son importantes durante la formación de humus, unen compuestos reactivos a través de la actividad enzimática, resultando una mezcla compleja de moléculas polimerizadas. En particular, los productos de degradación fenólica de la lignina producidos por hongos y otros microorganismos reaccionan entre sí con amino ácidos, péptidos, y con plaguicidas que poseen similares grupos funcionales {Figura III.9}.

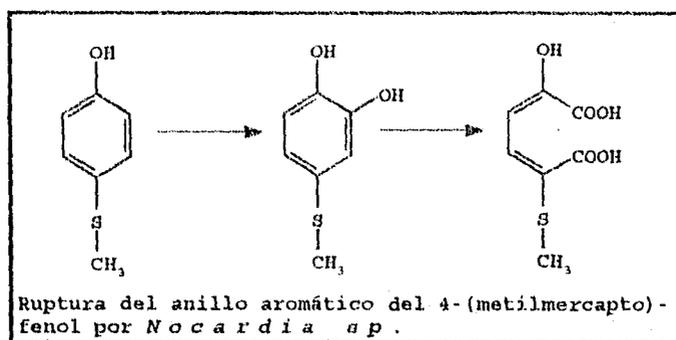
FIGURA III.9



8) **RUPTURA DEL ANILLO AROMÁTICO.**- Muchos plaguicidas orgánicos tienen uno o más anillos aromáticos, y consecuentemente, su catabolismo solo es posible si tiene lugar la ruptura del anillo. Numerosos microorganismos, especialmente bacterias, son capaces de romper al anillo bencénico. Los plaguicidas aromáticos con múltiples y diversas sustituciones son a menudo completamente resistentes al ataque microbiano, dependiendo de la configuración particular de la molécula; el tipo de enlace, el sustituyente(s) específico, su posición y su número, determina la susceptibilidad a la fisión del anillo. Usualmente los

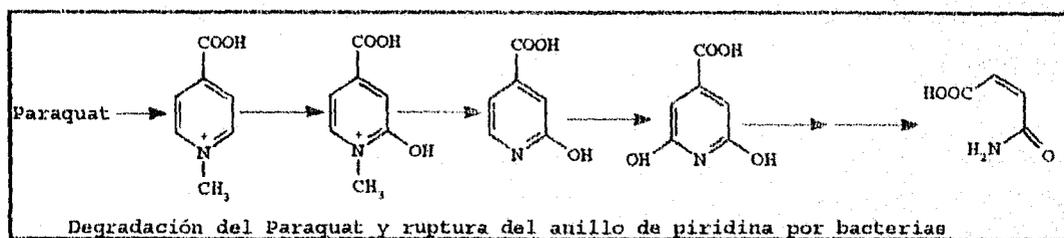
sustituyentes son modificados o eliminados y los grupos hidroxilo insertados en posiciones apropiadas antes de que las enzimas oxigenasas puedan causar la ruptura del anillo. La dihidroxilación es esencial para la fisión del anillo de benceno bajo condiciones aeróbicas {Figura III.10}. Más adelante se expondrá el mecanismo de hidroxilación y fisión aromática.

FIGURA III.10



9) **RUPTURA DEL ANILLO HETEROCICLICO.**- Los compuestos carboxílicos aromáticos que tienen anillos de heterocíclcos, también están sujetos al metabolismo microbiano. A estos compuestos heterocíclicos, sin embargo, se les ha prestado menor atención, debido a la dificultad para identificar sus metabolitos intermedios que se encuentran en cantidades traza. En plaguicidas con tales anillos de heterocíclcos, la ruta seguida para los procesos de degradación es complicada por los heteroátomos presentes, generalmente N, O y S, los cuales contribuyen a las características individuales significativas para las reacciones de descomposición. Estos compuestos pueden tener uno o más anillos de cinco a seis átomos siendo los más comunes los de seis miembros como piridinas, triazinas y pirimidinas. Sólo raramente se han trazado las rutas de descomposición sucesivas {Figura III.11}.

FIGURA III.11

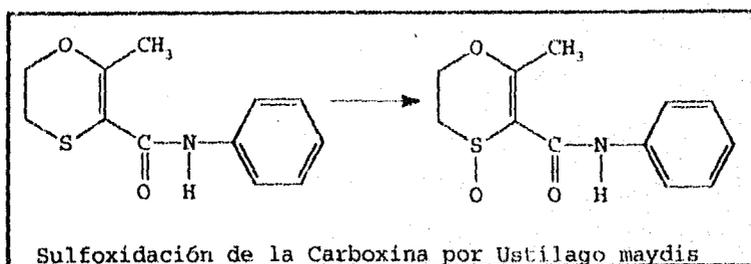


10) **SULFOXIDACION.**- Las reacciones de sulfoxidación implican la conversión enzimática de un compuesto divalente a un sulfoxido, y ocasionalmente a una sulfona:



La oxidación de sulfuros orgánicos (tioeteres), y sulfitos a los correspondientes sulfoxidos y sulfatos pueden ser catalizadas por microorganismos. Con frecuencia es difícil distinguir entre las reacciones biológicas y químicas. La observación de las reacciones de sulfoxidación en el suelo no pueden ser atribuidas a la actividad microbiana sin establecer que la catálisis es verdaderamente de origen biológico. Por ejemplo, para el fungicida sistemático carboxina se observa que en el suelo ocurre la sulfoxidación al óxido no fungitóxico, S-óxido (sulfoxido de carboxina), pero ya que la reacción también ocurre en suelos estériles, esto da una idea de destoxificación no debida a microorganismos {Figura III. 12}.

FIGURA III.12



11) **REACCIONES DE REDUCCION.**- Las principales reacciones de reducción se presentan en la tabla III-2.3. La reducción del grupo nitro a amina involucra la formación de intermediarios de un grupo nitroso e hidroxiamino. Este tipo de reacciones de reducción se ha encontrado durante el metabolismo microbiano de varios compuestos. Los plaguicidas organofosforados como el Paratión, Paraoxón, son a menudo reducidos a compuestos amino, los cuales son comúnmente inactivos como plaguicidas.

Los sulfoxidos son reducidos a sulfuros. Muchos plaguicidas poseen átomos de halógenos que son la causa real de su actividad y del consecuente problema ambiental; además, la eliminación del grupo halógeno es de primera importancia, y sus reacciones son casi

siempre de carácter reductivo; plaguicidas como el DDT, heptacloro, lindano o metoxicloro pueden ser reductivamente desclorados por varios microorganismos.

TABLA III-2.3

TIPO DE REACCION DE REDUCCION	REACCION
REDUCCION DEL GRUPO NITRO	$RNO_2 \longrightarrow ROH$ $RNO_2 \longrightarrow RNH_2$
REDUCCION DEL DOBLE O TRIPLE ENLACE	$Ar_2C=CH_2 \longrightarrow ArCHCH_3$ $RC=CH \longrightarrow RCH=CH_2$
REDUCCION DE SULFOXIDOS	$RS(O)R' \longrightarrow RSR'$
DESHALOGENACION REDUCTIVA	$Ar_2CHCl_3 \longrightarrow Ar_2CHCHCl_2$

Ar=Porción aromática

R=Porción orgánica

12) **REACCION HIDROLITICA.**- Las reacciones hidrolíticas son comunes en el metabolismo microbiano de plaguicidas. Muchos plaguicidas pueden ser degradados por una reacción hidrolítica con la adición simultánea de agua. Las enzimas involucradas en las reacciones hidrolíticas incluyen esterasas, acrilamidásas, fosfatásas, hidrolasas y liasas. Los plaguicidas que tienen enlaces tipo éster o amida pueden ser fácilmente susceptibles de hidrólisis con los productos resultantes que generalmente pierden su actividad plaguicida {Tabla III-2.4}. En caso de la deshalogenación hidrolítica, un halógeno es intercambiado con un grupo hidroxilo generado a partir del agua; de este modo, el proceso puede ser categorizado como una reacción hidrolítica.

TABLA III-2.4

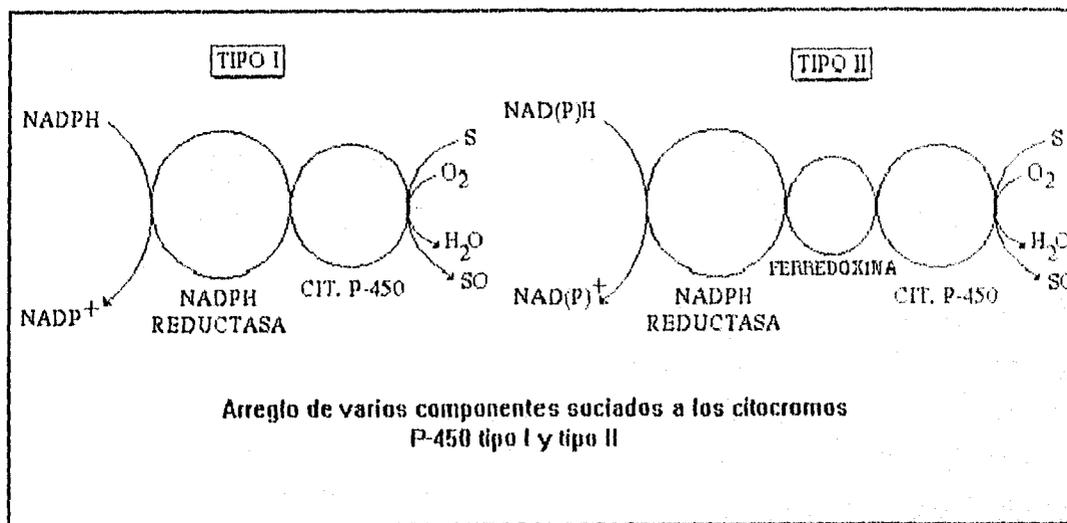
TIPO DE REACCION DE HIDROLISIS	REACCION
HIDROLISIS DEL ETER	$ROR' + H_2O \longrightarrow ROH + R'OH$
HIDROLISIS DEL ESTER	$RC(O)OR' + H_2O \longrightarrow RC(O)OH + R'OH$
HIDROLISIS FOSFORO-ESTER	$(RO)_2P(O)OR' + H_2O \longrightarrow (RO)_2P(O)OH + R'OH$
HIDROLISIS AMIDA	$RC(O)NR'R'' + H_2O \longrightarrow RC(O)OH + HNR'R''$
DESHALOGENACION HIDROLITICA	$RCI + H_2O \longrightarrow ROH + HCl$

Ar= Porción aromática

R= Porción orgánica.

La transformación de compuestos xenobióticos durante la biodegradación es posible gracias a una serie de reacciones que realizan los microorganismos y que se debe en gran parte a los sistemas de los citocromos P-450 que son usualmente sistemas multienzimáticos y requieren la participación de otras proteínas auxiliares para sus funciones catalíticas. Hay básicamente dos tipos de sistemas P-450 reportados hasta la fecha {Figura III.13}.

FIGURA III.13

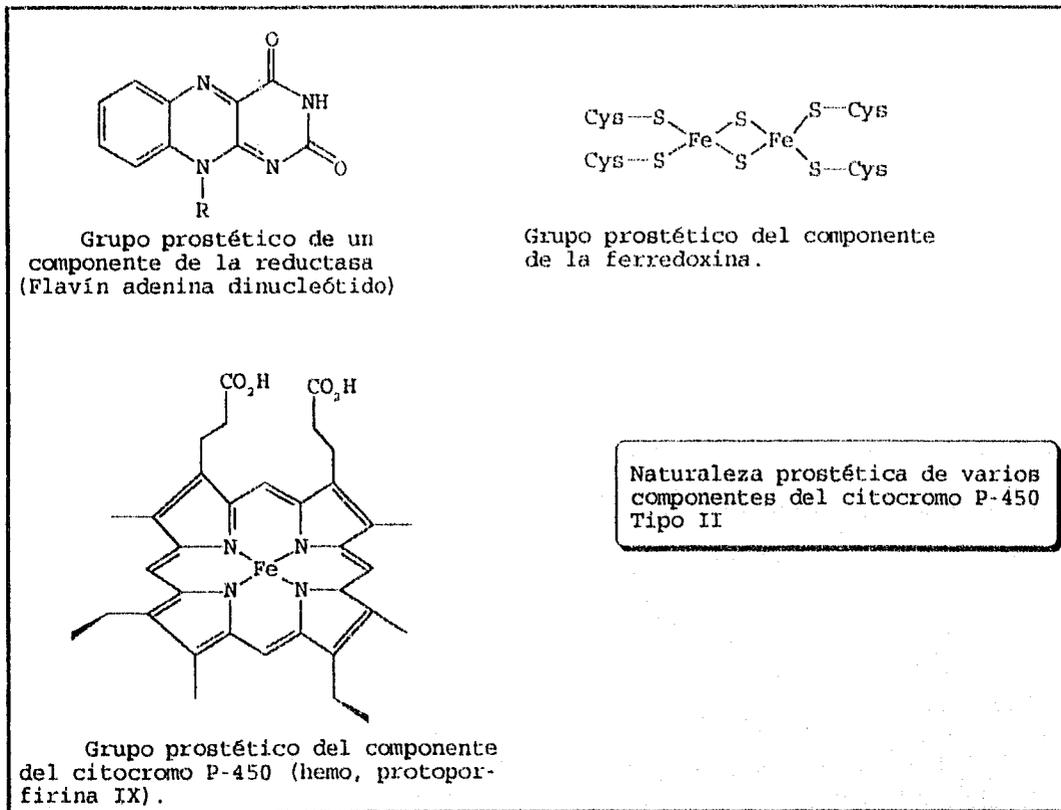


Los sistemas identificados en el retículo endoplásmico de organismos eucariotes corresponden al Tipo I y consisten de una reductasa que contiene FAD y FMN para el transporte de electrones del NADPH al componente P-450. En este tipo de organización los electrones son donados del NADPH al NADPH-citocromo P-450 reductasa. La NADPH-citocromo P-450 reductasa está compuesta de dos dominios en la región N-terminal que une a la membrana y al componente P-450, y un gran dominio hidrofílico que contiene un C-terminal y une a ambas flavina. En este caso, el flujo de electrones va del FAD a la FMN.

El segundo tipo de sistema P-450 (tipo II), el cual ha sido identificado en mitocondrias y bacterias, generalmente poseen una especificidad de sustrato muy estrecha. El Tipo II del citocromo P-450, en adición a la reductasa que contiene FAD, usa una pequeña proteína redox con hierro-azufre (ferredoxina) para la transferencia de electrones al componente terminal del P-450. En la figura III.14 ilustra la naturaleza prostética de los componentes de la proteína involucrados en el transporte de electrones en el sistema Tipo II P-450. El citocromo P-450 contiene un grupo simple

prostético hierro porfirina IX (hemo) ligado a la apoproteína por un único enlace tiolato con cisteína.

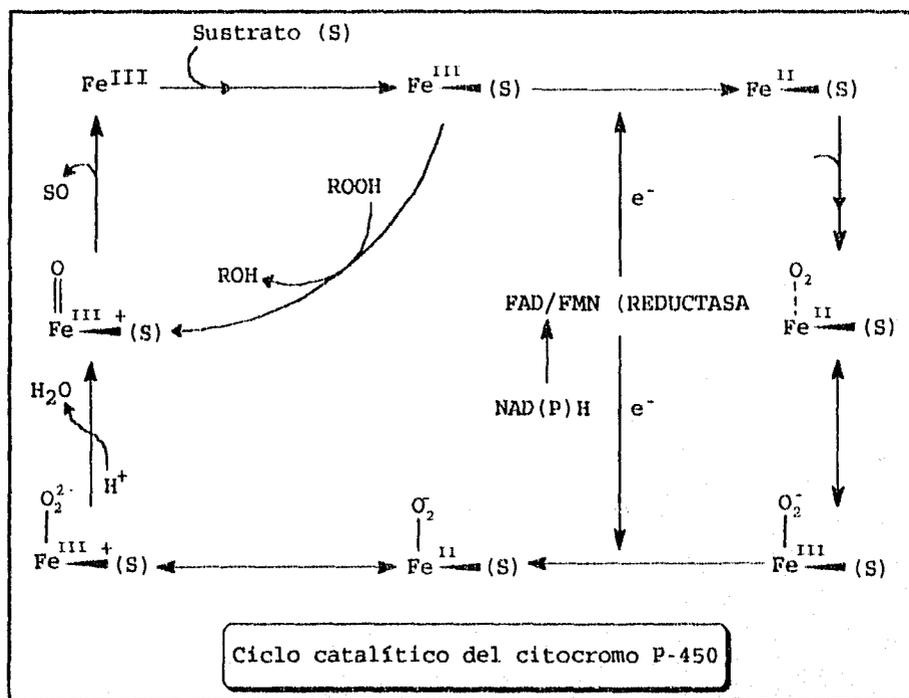
FIGURA III.14



Un tercer tipo de organización del componente P-450 se ha encontrado en la especie de *Bacillus megaterium*. En esta bacteria el P-450 es catalíticamente suficiente por sí mismo, no requiriendo la presencia de proteínas auxiliares transportadoras de electrones, efectúa sus reacciones oxidativas en presencia de piridín nucleótido reducido.

Todas las enzimas P-450 estudiadas a la fecha tienen ciclo catalítico común {Figura III.15} a través del cual rompen reductivamente oxígeno molecular llevando hacia la hidroxilación de su sustrato.

FIGURA III.15



III-2.2 HUMIFICACION Y POLIMERIZACION

En numerosos casos, la biotransformación sin la biodegradación, puede mejorar el grado de la toxicidad asociada con los contaminantes orgánicos vía humificación o mecanismos de polimerización. Aunque esto no es un ejemplo clásico de una biorremediación, no obstante, es una reacción común en el suelo que resulta en el traslado efectivo de los compuestos tóxicos de la fracción soluble del suelo a la fracción insoluble.

La biodegradación de los hidrocarburos del petróleo por uso de tratamientos parecidos a los métodos de las tierras de cultivo pueden conducir a la humificación de hidrocarburos poliaromáticos, y otros estudios han indicado que los compuestos halo-orgánicos relativamente

recalcitrantes tales como los PCBs y el PCP pueden ser incorporados dentro del material húmico.

En algunos casos la polimerización de los compuestos orgánicos puede conducir al incremento en la toxicidad como cuando las aminas aromáticas son polimerizadas para formar compuestos azo. No obstante, muchos productos polimerizados son menos tóxicos que el compuesto original; por ejemplo, varios compuestos fenólicos se encontraron menos tóxicos después de su copolimerización con componentes naturales del suelo tales como ácido siríngico [132].

III-2.3 ACUMULACION/ESTABILIZACION MEDIADA BIOLÓGICAMENTE

Los procesos biológicos o sus componentes pueden también ser usados para coleccionar o secuestrar los xenobióticos en su estado intacto sin modificaciones químicas. Por ejemplo, los metales pesados potencialmente tóxicos pueden ser concentrados y colectados por medio de enlaces específicos o no específicos del ión metálico a la célula, componentes celulares, o proteínas. Después de separarse físicamente del medio ambiente, pueden ser recobrados o estabilizados y enterrados. El material biológico adsorbe el material contaminante (bioadsorción), y el mecanismo es puramente físico o químico siendo el resultado final la acumulación del contaminante. Los componentes biológicos pueden estar vivos o muertos (inactivados) y el mecanismo no involucra necesariamente el metabolismo celular activo. Los resultados con algas en este aspecto han sido los más prometedores; sin embargo, también se ha probado que células bacterianas y fúngicas enlazan metales en solución.

Los mecanismos no-específicos de enlace son análogos a las resinas de intercambio de iones en que los componentes de la pared celular están formados de muchos grupos iónicos funcionales (grupos amino, carboxilo, hidroxilo). El enlace específico de los metales tales como cobre y cadmio son mediados por grupos sulfhidrilo específicos [132].

III-2.4 TRANSFORMACIONES ABIÓTICAS

La mineralización o la completa biodegradación de una molécula orgánica en el agua y suelo, es muchas veces consecuencia de la actividad microbiana. Pocos mecanismos abióticos en la naturaleza convierten totalmente los compuestos orgánicos a productos inorgánicos [37].

Sin embargo, las transformaciones abióticas también pueden influenciar el destino de los compuestos contaminantes y son de particular importancia en suelos y sedimentos. Las transformaciones abióticas tales como la hidrólisis, reacciones de óxido-reducción, y fotodegradación, son distintas de las pérdidas abióticas tales como la absorción, lixiviación y remoción, las cuales resultan en la migración del compuesto intacto (por ejemplo del suelo al aire). Es importante el entendimiento de estas reacciones que pueden ser usadas para ciertos tipos de biorremediación porque así puede completarse la detoxificación y degradación de diferentes reacciones que a veces son incompletas en una biotransformación.

Las reacciones hidrolíticas son decisivas para determinar el destino de ciertos compuestos orgánicos en el suelo. Con muchos plaguicidas, una hidrólisis abiótica inicial puede ser el primer paso de la degradación para generar productos los cuales son subsecuentemente mineralizados por microorganismos del suelo lo cual puede ser considerado como degradación abiótica-biótica.

El efecto de la radiación solar en la disipación o atenuación de los compuestos químicos contaminantes ha sido estudiada principalmente en el tratamiento de plaguicidas, y es otro ejemplo del papel potencial que las transformaciones abióticas pueden jugar en la biorremediación. Por ejemplo, se ha comprobado que la radiación solar contribuye a la biodegradación parcial de los PCBs *in vitro*.

Inversamente, las transformaciones abióticas pueden completar las degradaciones que fueron iniciadas por el metabolismo microbiano. Por ejemplo, herbicidas tales como las acilanilinas son parcialmente biodegradadas en el suelo a un intermediario que es subsecuentemente incorporado dentro del material húmico vía mecanismos abióticos.

Las pérdidas abióticas de los contaminantes ocurre por medios físicos que incluyen remoción, lixiviación, o absorción [132]:

Remoción.- Ocurre en materiales volátiles como son el clorobenceno y el nitrobenzeno. En este caso, el compuesto es eliminado de la matrix contaminada pero no debida a los microorganismos, sino al cambio de medio que va del suelo al aire.

Lixiviación.- Puede ocurrir porque el compuesto es soluble en agua o, si no es soluble, porque se une a otros componentes del suelo; por ejemplo, los compuestos considerados como insolubles en agua como los PCBs pueden unirse a superficies hidrofóbicas del humus soluble con lo cual son movilizados. Otro ejemplo se presenta en la biodegradación anaerobia del TNT que procede vía reducción del grupo nitro a intermediarios aminos que, en presencia de oxígeno, se dimerizan a compuesto diazo que son lixiviables.

Absorción.- La absorción del compuesto, especialmente en compuestos insolubles en un componente de la matriz contaminada, o en biopelículas dentro del biorreactor, puede ser de una magnitud tal que aparentemente el compuesto ha desaparecido sobreestimado la biodegradación del compuesto. Un ejemplo es la degradación de los PCB en los biorreactores.

III-2.5 FACTORES QUE AFECTAN LA BIODEGRADACION

El grado de descomposición microbiana de un compuesto químico en el suelo y en medio líquido es mediado por tres factores:

- 1) Disponibilidad del compuesto químico.
- 2) La cantidad de estos microorganismos o sistemas enzimáticos.
- 3) El nivel de actividad de estos organismos o sistemas enzimáticos.

La disponibilidad de un compuesto químico para una población microbiana en medio sólido o líquido es determinado por las propiedades físicas del compuesto. Los factores ambientales tales como pH, temperatura, nivel de humedad del suelo, y composición del suelo son reguladores importantes de la actividad microbiana, y además del grado de degradación del compuestos químico [37].

Las razones por las que un compuesto es recalcitrante son imagen en el espejo de los factores que afectan el grado y extensión de la biodegradación {Tabla III-2.5} en un medio ambiente particular [49].

TABLA III-2.5

FACTORES QUE AFECTAN LA BIODEGRADACION	POSIBLES RAZONES PARA LA RECALCITRANCIA
EN LA MOLECULA	Concentración del sustrato alta (tóxica) o baja
Concentración Solubilidad en agua; agua/lípido. Coeficiente de partición Sólido/líquido/gas; volatilización.	El sustrato es adsorbido a arcilla, humus o es físicamente inaccesible.
Toxicidad Posibilidad de reacciones espontáneas no-enzimáticas	La temperatura, pH, pO ₂ es alta o baja; las condiciones iónicas son inapropiadas.
EN EL MEDIO AMBIENTE	Los organismos apropiados no existen o no están presentes en el medio, quizás por depredación, parasitismo o viabilidad pobre.
Disponibilidad mecánica	Hay inadecuados nutrientes o co-metabolitos.
pH, pO ₂ , temperatura, potencial redox, Presencia de interfases.	El sustrato no es susceptible al ataque inicial por ser grande y/o insoluble y no hay las apropiadas enzimas extracelulares.
Composición y concentración iónica.	El sustrato:
Calidad e intensidad de luz	-No es transportado al interior de la célula.
Presencia de co-metabolitos, nutrientes esenciales, radicales reactivos, otros compuestos orgánicos e inorgánicos.	-No hay para él las enzimas adecuadas.
Presencia de organismos apropiados y plásmidos.	-No induce las enzimas apropiadas o factores de transporte.
Cantidad de agua	-Es convertido a productos tóxicos o interfieren con el metabolismo celular.

III-3 LA BIOTECNOLOGIA EN LA BIORREMEDIACION

El mantener la calidad ambiental ha sido un problema continuo desde la aparición de la civilización. El hombre, a través de sus actividades industriales, agrícolas y domésticas, ha provocado modificaciones físicas, químicas y biológicas en su medio ambiente, muchas de las cuales han tenido un efecto negativo. La biotecnología tiene un impacto muy importante en el control y mantenimiento de la calidad ambiental. Esto es manifestado a través del mejoramiento e innovación de los procedimientos de tratamiento de desechos, así como el aumento del uso de la biotecnología en la industria química y agrícola.

Las industrias están rápidamente desarrollando nuevas técnicas que emplean el uso de microorganismos para producir sistemas de reciclamiento, control de efluentes, fuentes alternativas de energía y productos químicos de uso industrial, así como un nuevo aprovechamiento de la agricultura. En los países subdesarrollados, esta actividad, conocida como tecnología apropiada, podría brindar un incremento sustancial en el estándar de vida y más importante, en la calidad de vida de muchas personas [7].

III-3.1 GENERALIDADES

La remediación ambiental, específicamente la limpieza de suelos contaminados, y diversos cuerpos de agua, es uno de los problemas técnicos y sociales que se nos presenta actualmente. Los contaminantes tienen diversos orígenes y causan una serie de problemas que inclusive se presentan lejos del sitio de contaminación. También los sitios que se encuentran contaminados son variados y las tecnologías que se han utilizado para el tratamiento. Dichas tecnologías usadas en el tratamiento de los residuos peligrosos se han agrupado en las siguientes categorías [116]:

- Físicas.
- Químicas.
- Biológicas (Biorremediación).

- Destrucción térmica.
- Procesos de fijación y estabilización.

La biorremediación, en términos sencillos, es el uso con fines benéficos de los microorganismos y algunos tipos de plantas en la restauración de sitios contaminados [89].

En general, un proceso bioquímico normal para los microorganismos, degradar los compuestos que encuentra en su medio ambiente con el fin principal de obtener carbono y energía para su metabolismo, se ha convertido en un proceso tecnológico para remediar gran parte de la contaminación que sin querer, nosotros mismos hemos provocado. Es así que utilizadas conscientemente y aplicadas, a veces con una sofisticada tecnología, las notables capacidades degradativas de diversos microorganismos se convierten en el conjunto de procesos que se han dado en llamar biorremediación.

La biorremediación puede ser un proceso realizado por una sola especie microbiana o por varias especies [12].

Los procesos biológicos aplicados a la remediación de la contaminación se han utilizado desde la primera década de este siglo por ejemplo, para tratar desperdicios no refractarios como aguas negras, aunque su uso para el tratamiento de desechos químicos peligrosos, (asociados con la actividad de industrias químicas), es más reciente.

Este aumento en las aplicaciones de la biorremediación se debe, en parte, al progreso del conocimiento que se ha ido adquiriendo acerca de cómo metabolizan los microorganismos existentes los compuestos químicos recalcitrantes y además, gracias al desarrollo de las técnicas de DNA recombinante y al diseño de nuevas capacidades metabólicas se han aislado estos microorganismos para enfrentar nuevos retos de eliminación de contaminantes.

Por lo anterior, se ha incrementado el repertorio de reacciones biocatalíticas útiles para aplicaciones en biorremediación que es posible utilizar ya sea con las células intactas, componentes celulares o enzimas aisladas [12].

Si se tiene en cuenta la heterogeneidad de los contaminantes, por ejemplo, los derrames de petróleo contienen miles de hidrocarburos con diferentes estructuras, la biorremediación

representa un verdadero reto, ya que normalmente los microorganismos degradan una sola clase muy específica de compuestos; los compuestos con una pequeña variación en la posición de los sustituyentes pueden permanecer refractarios al ataque de la misma enzima microbiana.

En el caso de los aceites refinados se encuentran cientos de diferentes compuestos; los bifenilos policlorados son un grupo que representa una gran variedad de clases (ver capítulo IV-9.1). Es frecuente también que en muchos sitios los contaminantes sean combinaciones indefinidas de aceites, plaguicidas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos.

Cuando un suelo está contaminado con compuestos aromáticos, se encuentran normalmente microorganismos que degradan benceno, tolueno, etil benceno y xilenos en el subsuelo. Estos compuestos pueden degradarse por un proceso aeróbico que los transforma en catecol o protocatecato, los que pueden oxidarse totalmente por lo que mantienen el crecimiento del microorganismo; en este caso hay que adicionar una fuente de nitrógeno para complementar el suelo en el que se encuentran dichos microorganismos [26].

Como una alternativa, los procesos de biorremediación pueden estimular la velocidad de lixiviación de algunos contaminantes recalcitrantes; este problema se presenta también en bodegas de almacenamiento (contención), de residuos peligrosos como es el caso de combustibles fósiles pesados, de creosota y explosivos (TNT y otros nitroaromáticos).

III-3.2 MECANISMOS DE BIORREMEDIAION

Las diversas opciones de biorremediación incluyen muchos diferentes tipos de mecanismos de atenuación que puede, dependiendo de la naturaleza del compuesto y de la matriz contaminada, producir diversos resultados finales. Los mecanismos característicos de la biorremediación pueden resultar en la separación física, destoxificación, o destrucción del compuesto contaminante [132]. La habilidad para predecir la liberación y flujo de los

contaminantes desde la fuente de desechos es un paso crítico en la aseguración del impacto para el medio ambiente y para el diseño de la estrategia de biorremediación.

La mezcla de contaminantes en la superficie son sujetos a la acción simultánea de diversos procesos químicos y microbiológicos. Muchos factores y variables están involucrados en la migración de contaminantes en la superficie. Algunos de estos factores son la capacidad de adsorción del suelo y la de los contaminantes en particular o de la mezcla de contaminantes. La transferencia microbiana de adsorción y de absorción de los microorganismos puede afectar la migración de los contaminantes. Las condiciones de la superficie tales como la disponibilidad de oxígeno, pH y temperatura también pueden afectar el grado de migración del compuesto [145].

La biodegradación puede ocurrir sin la migración de contaminantes de una parte del medio ambiente a otra, como es a menudo el caso con otros métodos de remediación: remoción de aire de aguas freáticas contaminadas, incineración de materiales contaminados, y la siempre usada adsorción con carbón activado. Todo contribuye a la contaminación cruzada por la producción de residuos peligrosos a menudo más concentrados que la forma original que necesitaba ser dispersa [20,50].

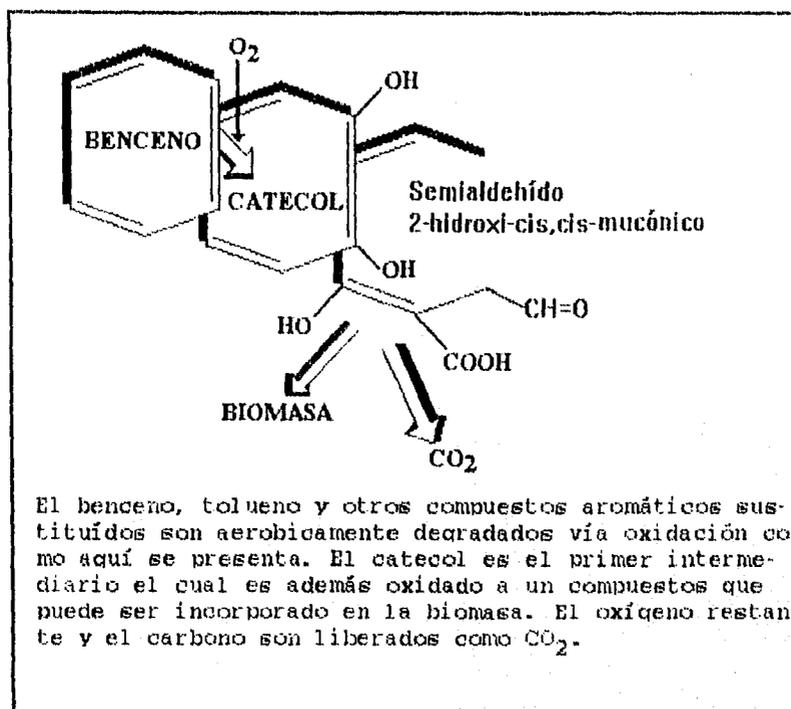
Las bacterias que están presentes naturalmente en el medio ambiente son capaces de degradar una amplia variedad de contaminantes orgánicos {Tabla III-3.1}. La vasta mayoría de los contaminantes que a la fecha han sido tratados por biorremediación son derivados del petróleo incluyendo combustibles, solventes del petróleo como acetona y cetonas y HPAs presentes en alquitrán de carbón y creosota [76].

TABLA III-3.1

BIODEGRADABILIDAD DE DESECHOS ORGANICOS PELIGROSOS		
RAPIDAMENTE DEGRADABLE	MODERADAMENTE DEGRADABLE	DIFICIL DE DE GRADAR
Gasolina, combustible disel. Tolueno, benceno, alcohol isopropilico, metanol, acetona, cetonas, fenoles, acrilonitrilo.	Petróleo crudo, lubricantes, alquitrán de carbón, creosotas, pentaclorofenol, nitrobenceno, anilina, naftalenos, compuestos alifáticos de cadena larga.	TCE, PCE, cloruro de vinilo, PCBs, DDT, Clordano, Heptaclor

Los procesos de biorremediación comercial usados para la biodegradación del petróleo así como para el tratamiento de los desechos peligrosos utilizan bacterias aeróbicas presentes en forma natural en el medio ambiente. Por medio de una secuencia de pasos metabólicos la bacteria oxida el carbono contenido en los contaminantes a dióxido de carbono y agua {Figura III.16}, y algo del carbono es incorporado a la formación de nueva biomasa [76].

FIGURA III.16



Para desarrollar un proceso de biorremediación se deben de tomar en cuenta: (1) el problema y el sitio (el o los compuestos a degradar y su ubicación), en el que realizaría la biorremediación, (2) desarrollar la tecnología en estudios de laboratorio, (3) contar con métodos de monitoreo del proceso y (4) evaluar el proceso. Las biorremediaciones tradicionales se realizan en el suelo, sedimentos, agua y efluentes industriales, aunque muchas se llevan a cabo en biorreactores con tecnología específica [12].

La industria de la biorremediación es un excelente ejemplo de la aplicación de organismos degradadores para la limpieza del medio ambiente. La Tabla III-3.2 enumera algunas de las compañías (en los Estados Unidos) involucradas en la biorremediación y su aplicación.

TABLA III-3.2

COMPANIA	UBICACION	APLICACION
Advances Mineral Technology	Golden, Colorado	Metales Pesados.
Air Products and Chemical	Trexletown, Pensilvania	Compuestos orgánicos
Amgen	Thousand Oaks, California	Tricloroetileno
Battelle	Colombus, Ohio	Aromáticos clorados
Bioclean	Bloomington, Minesota	Pentaclorofenol
Biotechnica	Cambridge, Massachusetts	Fenol
Chemical Waste Management	Chicago, Illinois	Desechos tóxicos.
Celgene	Summit, Nueva Jersey	Aromáticos clorados
Ciba-Geigy	Greensboro, Norte California	Herbicidas
Detox	Dayton, Ohio	Compuestos orgánicos.
Dow	Midland, Michigan	Clorofenoles
Ecova	Redmond	Solventes
Flow	Orange, California	Aguas negras
G.E.	Schenectady, Nueva York	Policlorobifenilos
Genex	Gaithersburg, Maryland	Desechos tóxicos.
Groundwater Technology	Norwood, Massachusetts	Solventes
Homestake Mining	Reno, Nevada	Cianuro
IGT	Chicago, Illinois	Carbón mineral, sulfuros, compuestos halogenados y aromáticos.
IITRI	Chicago, Illinois	Dicamba
Monsato	San Luis, Missouri	Herbicidas
Occidental Chemical	Grand Island, Nueva York	Aromáticos Clorados
Sandoz Crop Protection	Des Plaines, Illinois	Herbicidas

Para seleccionar los mecanismos de biorremediación y su integración con otras tecnologías es necesario primero conocer y entender cuales contaminantes son susceptibles a la biorremediación así como sus propiedades químicas y físicas (solubilidad, volatilidad, biodegradabilidad), y como los microorganismos son afectados por su presencia en el medio

así como la evaluación de la distribución en los cuales puede estar localizado un contaminante en particular:

- 1.-Adsorción a suelos saturados ó insaturados.
- 2.-Disolución en aguas subterráneas.
- 3.-Líquido flotante en aguas subterráneas o sedimentado en una capa geológica.
- 4.-Como vapor.

Es de gran importancia también, conocer las características del sitio ya que este juega un papel determinante en la efectividad de la biorremediación. Tales características incluyen la geología, hidrogeología, permeabilidad del suelo, contenido de humedad, química del suelo y rango de temperatura [76,100,120].

El lugar donde se va efectuar la biorremediación puede ser realizado con tratamiento in situ o in vivo con células si el suelo puede ser excavado. La excavación, sin embargo, requiere que el compuesto contaminante se accesible y se encuentre poco profundo. En contraste, la biorremediación in situ puede ser implementada si se encuentra bajo edificios y otras áreas con gran actividad y con poco o ningún impacto en las operaciones diarias; para una contaminación profunda o diseminada, la biodegradación in situ es a menudo más efectiva, costable y aprovechable [76].

Hay que tener en cuenta también si lo que se busca es destrucción, destoxificación o eliminación física del compuesto contaminante, ya que existen diferentes tipos de mecanismos de atenuación que, dependiendo de la naturaleza del compuesto a tratar y del sitio donde se encuentra, pueden producir distintos resultados finales. Un compuesto puede desaparecer: eliminar físicamente (secuestrar, destruir), o atenuar, aliviar, reducir su toxicidad o bien, en el caso de los metales y sus compuestos recolectar y posteriormente eliminar el compuesto tratado [12].

La biorremediación in situ puede ser llevada a cabo por dos diferentes caminos: con ingeniería o intrínseca.

La ingeniería de la biorremediación es para acelerar el grado de biodegradación así el tiempo de limpieza es disminuído muchas veces. Esto ocurre cuando el crecimiento y

actividades biodegradativas del microorganismo son acrecentadas por la adición de aceptores de electrones (como el oxígeno).

La biorremediación intrínseca es usada para sitios de contaminación concentrada, tales como estanques de hidrocarburos o fugas en tierras de relleno previniendo migración de los contaminantes fuera de la fuente. Los aceptores de electrones así como los nutrientes son naturales.

Actualmente la biorremediación in situ es frecuentemente usada en los E.U. para la limpieza de los sitios contaminados con petróleo y sus derivados.

Los casos de estudio involucrados en la aplicación de la biorremediación son [120]:

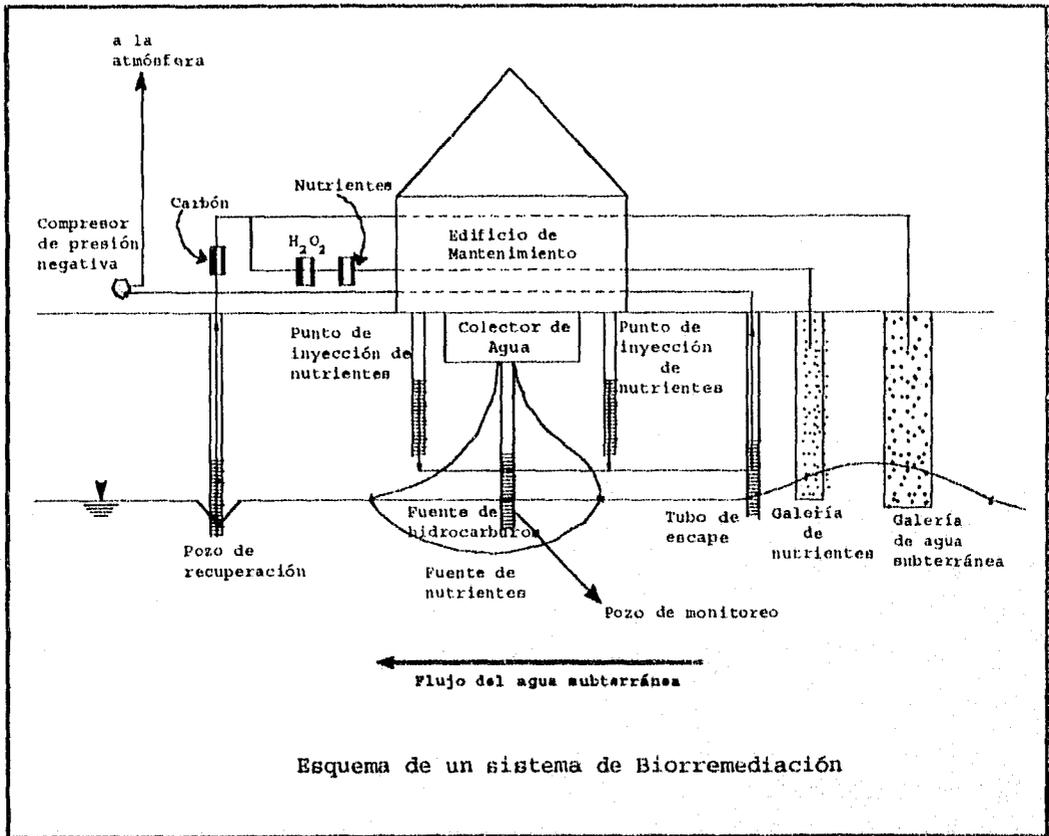
- a) La biodegradación con ingeniería del benceno, etil benceno y xileno por debajo de los tanques que tienen fuga de gasolina y combustible diésel
- b) La biorremediación intrínseca de un pozo de depósito de gas natural.
- c) La degradación de TCE y otros solventes clorados por bacterias metano-oxidantes.
- d) La biodegradación de PCBs de sedimentos in situ.

El grupo Public Service Company of Colorado hired Groundwater Technology, Inc, Englewood, Colorado diseñó un sistema de biorremediación in situ en Denver para la eliminación de hidrocarburos no-volátiles derivados del petróleo usados en los motores diésel y gasolina acumulados en el suelo. El sistema utiliza la microflora autóctona que es estimulada para degradar los contaminantes. El método convierte los desechos orgánicos en biomasa y productos inofensivos del metabolismo tales como dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas.

En ambientes saturados las aguas de cultivo son recuperadas, adicionadas con nutrientes y refiltradas. El oxígeno es adicionado por inyección de peróxido de hidrógeno o instalado en un sistema de aspersión. Los nutrientes son adicionados por medio de inyección o filtración. El oxígeno es normalmente proporcionado a través de un sistema de extracción de vapor con presión negativa {Figura III.17}. El peróxido de hidrógeno puede proveer grandes cantidades de oxígeno disuelto en la fase acuosa además de que puede oxidar compuestos orgánicos complejos bajo ciertas condiciones como las que se encuentran en las aguas con petróleo. Las bacterias responsables de la biorremediación pueden usar el oxígeno disuelto producido por la

disociación del H_2O_2 y/o nitratos provenientes de la oxidación de compuestos de amonio de la solución nutritiva como aceptores finales de electrones [100].

FIGURA III.17



Algunos de los ejemplos de aplicación de las diversas tecnologías de biorremediación son los siguientes:

1.- Limpieza de derrames de petróleo en el medio ambiente después de la limpieza física como en los casos de [51]:

A) Liberación deliberada de petróleo por las fuerzas iraquíes durante la ocupación de Kuwait. Se observó la aparición de un consorcio compuesto de microorganismos fotosintéticos y no fotosintéticos, entre los cuales destacan las cianobacterias las cuales

- crecen sobre la superficie de la mancha de petróleo en las costas de Saudi (Arabia) y es el primer signo de autolimpieza del sitio de contaminación en este sitio [131].
- B) Derrame de petróleo en las costas de Alaska por el Exxon Valdés [139].
- C) Aceleración de la degradación microbiana en los suelos de la tundra [126].
- 2.- La tecnología es necesaria para remover o degradar diversos contaminantes del suelo (plaguicidas) antes de que la calidad de los mantos fráticos se vea afectada [96].
 - 3.- La tecnología puede cambiar un compuesto recalcitrante natural al introducir poblaciones de microorganismos con habilidades degradantes no presentes en el sitio de la contaminación en forma natural [81].
 - 4.- Uso de la modificación genética de microorganismos para el aislamiento de enzimas que contengan las habilidades degradativas requeridas para el tratamiento de sitios profundos de contaminación [18].
 - 5.- Se usa la estimulación de microorganismos autóctonos metanotróficos por la adición de metano y oxígeno requiriendo de varios meses para llevarse a cabo la completa eliminación del solvente de los sitios contaminados (suelos saturados, insaturados, mantos freáticos y lechos de tierras de rellenos sanitarios) con solventes clorados como el CCl_4 [128,133].
 - 6.- Uso de asociaciones microbianas autóctonas y adaptadas que ofrecen la posibilidad de una rápida, efectiva y económica técnica para remover los compuestos organometálicos en concentración baja transformándolos a compuestos menos tóxicos [25].
 - 7.- Tratamiento y limpieza de mantos freáticos contaminados con desechos líquidos de contenido radioactivo provenientes de la VSDDE en Hanford [128,129].
 - 8.- Remediación de áreas menos contaminadas que no son excavadas. Tratamiento termal (incineración), después de un derrame de petróleo [68,102].
 - 9.- Uso de biorreactores rotativos para la remediación biológica de suelos contaminados con antraceno [58].

Una biodegradación transforma la estructura de un compuesto; una destrucción o atenuación se puede hacer por reacciones de síntesis, por desplazamiento de átomos o por oxidación a CO_2 y H_2O . En todos los casos se logra una destoxificación.

En el caso de una biodegradación parcial, la remediación se considera eficiente sólo si el compuesto tratado ha perdido su toxicidad o que se ha convertido en un compuesto que es, a su vez, susceptible de degradar para perder su toxicidad. Estas reacciones secundarias pueden realizarse por un proceso abiótico cuyo resultado puede ser una polimerización o una degradación espontánea.

Un compuesto a tratar puede mantener el crecimiento del microorganismo cuando es utilizado como aceptor de electrones o cuando provee de la suficiente fuente de carbono o ambas cosas [132].

La biorremediación in situ, en la cual los microorganismos degradan compuestos en el sitio de la contaminación no está libre de controversias y a menudo es mal entendida porque no es fácil detectar a los organismos por los cuales se realiza el proceso [49,132]. Las complicaciones ocurren en la zona del subsuelo haciendo la operación y la evaluación de la biorremediación in situ mucho más exigentes que las tradicionales aplicaciones biotecnológicas, tales como el tratamiento de las aguas de desecho. Muchas de las complicaciones más importantes son la no-uniformidad de la superficie, y la dificultad y gasto de la obtención de muestras representativas además de que mucha de la contaminación queda fuera del alcance de los microorganismos porque estos son atrapados en fases líquidas no-acuosas o son adsorbidos en partículas sólidas [120].

Muchos nuevos procesos de biorremediación son comunes y accesibles para limpiar las costas contaminadas con petróleo proveniente de derrames de buques petroleros. Sin embargo, la eficiencia de estos procesos cuando son usados a campo abierto es aún controversial; es muy difícil distinguir entre el efecto de biodegradación por sí misma y el efecto del lavado mecánico debido a la acción de las olas y de las mareas [87].

Entre las limitaciones para la aplicación biotecnológica de la biorremediación se encuentran:

A) Que puede utilizarse únicamente para tratar contaminantes biodisponibles. Los compuestos que están adheridos a humus o arcilla son muy difíciles de biodegradar.

B) Que pueden quedar una contaminación remanente en el suelo cuando la concentración del contaminante que mantiene el crecimiento del microorganismo es ya muy baja.

Sin embargo, la alternativa del cometabolismo logra superar estos problemas (ver página 40) [132].

III-3.3 TRATAMIENTO DE AGUAS Y EFLUENTES

Una planta de tratamiento de aguas residuales se diseña para remover de éstas los sólidos orgánicos e inorgánicos o sustancias tóxicas que sean nocivas a la calidad de los cuerpos receptores en donde se pretenda disponerlas [3].

Los diversos procesos que se usan para el tratamiento de las aguas residuales que van a ser descargadas en un cuerpo receptor consta de las siguientes etapas de tratamiento [3,8]:

- 1)Coagulación.- Se refiere a la formación de flóculos precipitados mediante los cambios fisicoquímicos que tienen lugar entre el coagulante soluble y la alcalinidad del agua. Esto incrementa el tamaño de los sólidos suspendidos en el agua hasta un punto en que estos puedan sedimentarse.
- 2)Floculación.-Consiste en agitar suavemente el agua tratada con el coagulante, durante un periodo de tiempo apreciable, para completar las reacciones de coagulación, hasta alcanzar condiciones que permitan que el material floculento se junte y adhiera formando grandes masas. además el material floculante deberá remover el color del agua que es de caracter coloidal.
- 3)Sedimentación.- Es usado para recoger todos los flóculos pesados que ha atrapado la materia en suspensión. Este paso permite disminuir la carga en los filtros de arena.
- 4)Clarificación.-Se utiliza para eliminar gran parte de la turbidez y sedimentos encontrados en las aguas superficiales.
- 5)Filtración.- Es una operación unitaria clasificada dentro de las separaciones mecánicas. Implica separar partículas sólidas contenidas en un fluido. Es usado para eliminar y reducir los sólidos suspendidos los cuales:(1)pueden estar presentes

en el agua cruda que va a ser tratada o (2) puede resultar de los procesos de coagulación o procesos de precipitación.

- 6) Aereación.- Es el proceso mecánico por el cual se procura un contacto íntimo con el agua. Aunque a menudo la meta es disolver oxígeno en el agua, la aereación incluye también la eliminación de gases indeseables del agua, tales como CO₂ y metano.
- 7) Cloración.- Es de vital importancia en los abastecimientos públicos de agua para la obtención de agua de calidad sanitaria.

En el tratamiento biológico de las aguas residuales en las instalaciones de tratamiento (por ejemplo según los procedimientos de lodos activados o el tanque depurador por filtración) los microorganismos desempeñan una función análoga a la que desarrollarían en la autodepuración natural de ríos, lagos, arroyos, etc.

El lodo activado de las instalaciones de tratamiento posee una población microbiana característica que consta principalmente de bacterias y protozoarios, mientras que los hongos desempeñan un papel mucho menos importante. Las bacterias más representativas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Sphaerotilus* y *Nocardia*. También intervienen gusanos y larvas de insectos en los tanques depuradores.

La potabilización de las aguas superficiales se verifica igualmente con el auxilio de microorganismos. En los filtros de arena de las instalaciones distribuidoras de agua se encuentra una microflora característica compuesta en lo esencial de algas, protozoarios y bacterias los cuales liberan el agua de sustancias extrañas que se encuentran en la capa superior mediante procesos de oxidación-reducción. Pero las bacterias que se encuentran en el agua son eliminadas también gracias a los procesos de filtración y los protozoarios que las ingieren. El agua que se ha de distribuir no debe contener coliformes ni estreptococos [119].

Los sistemas de tratamiento de efluentes, originalmente diseñados para eliminar aeróbicamente compuestos orgánicos del agua para reducir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), se han modificado para incluir en ellos un componente anaeróbico en el sistema que permite eliminar también algunos compuestos inorgánicos; por ejemplo, se pueden eliminar nitratos del agua, utilizando un sistema de lecho fluido y ayudando así a evitar la eutroficación.

Las bacterias metilotróficas que llevan a cabo un proceso de desnitrificación, pueden crecer mejor si se agrega metanol al biorreactor. Este se elimina por filtros de goteo y de carbón granular activado. Las bacterias convierten los nitratos a nitritos y después a nitrógeno molecular, si estos microorganismos están operando en condiciones co-metabólicas, pueden degradar cloroformo, aunque obviamente obtienen su energía del co-sustrato [4].

III-3.4 TRATAMIENTO DE SUELOS

El biotratamiento de suelos es una alternativa a los métodos fisicoquímicos para el tratamiento de suelos. el método biológico se ha mostrado eficaz en el laboratorio y en plantas piloto, así como a escala industrial en aplicaciones comerciales.

De manera natural, las bacterias, hongos, levaduras y algunas cianobacterias son capaces de llevar a cabo oxidaciones aeróbicas de muchos xenobióticos en el suelo. en este caso, también se requieren nutrientes para incrementar el proceso natural. La cantidad y tipo de nutrientes depende de la naturaleza del suelo y de la concentración de los contaminantes.

Cuando el factor limitante para la biodegradación es el oxígeno, la adición de peróxido de hidrógeno puede acelerar el proceso de degradación de los xenobióticos. La adición de un adsorbente también aumenta la biodegradación de ciertos hidrocarburos contaminantes [97].

Los diferentes procedimientos de tratamientos de suelos utilizan microorganismos previamente seleccionados para la biodegradación que, además, estimulan la actividad microbiana autóctona. Sin embargo, las variaciones entre los diferentes procedimientos dependen de varios factores, entre ellos, la distancia del nivel freático a la superficie, la oxigenación, el potencial redox y otras características físicas del suelo [24].

En condiciones anaeróbicas los microorganismos que crecen en los desperdicios contaminantes de los sitios de tiraderos municipales en donde pueden en ocasiones producir combustibles potencialmente utilizables para uso industrial o doméstico. El biogas (55%

metano), es producido por un consorcio de bacterias anaeróbicas que incluye arqueobacterias metanogénicas [4].

III-3.5 TRATAMIENTO DE EMISIONES GASEOSAS

Recientemente ha adquirido importancia la depuración del aire contaminado mediante procesos biológicos. A tal fin, se aprovecha la capacidad que tienen los microorganismos para degradar sustancias volátiles. Se emplea agua enriquecida con las correspondientes bacterias que circula por un tanque de aireación. Dicho sistema tiene aplicación en ganadería para desodorar, por ejemplo, en el aire evacuado en las grandes porquerizas. En el sur de Alemania lo está utilizando una industria fundidora a gran escala para limpiar 120 mil m³ de aire por hora, el cual contiene principalmente fenoles, formaldehído y aminas terciarias [119].

En Europa se ha hecho una modificación de la tradicional filtración por goteo desarrollando biofiltros que permiten tratar emisiones de gas y proteger o conservar la calidad del aire. Los organismos que intervienen en procesos de tratamiento de contaminantes del aire son comunidades microbianas múltiples que crecen sobre las superficies sólidas de las columnas de filtración, formando una biopelícula que degrada eficientemente (hasta un 95%), el gas que atraviesa los filtros [119,67].

Algunos compuestos volátiles son degradados en esta forma por consorcios de hongos que son capaces de asimilar el estireno y además degradan tolueno, xileno, α -metil estireno y propeno.

Varias industrias han utilizado este sistema, tanto fabricantes de pinturas como procesadoras de alimentos y maderas (producción de triplay)[61,119].

IV.- PROCESOS DE BIODEGRADACION Y MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS

Los microorganismos componentes naturales de ambientes acuáticos y terrestres, son agentes potenciales para las transformaciones biológicas de diversos compuestos (ubícuos y contaminantes) que entran o están en forma natural en un ecosistema. Usualmente ocupan un volumen menor del 0.1% del suelo, pero son responsables de numerosas transformaciones en el ciclo de los elementos y energía en la naturaleza como ya se ha descrito. La densidad microbiana puede ser tan grande como 10^9 por grano de suelo, con una biomasa de varias toneladas por hectárea. La población microbiana existe en un equilibrio dinámico formado por interacciones de factores bióticos y abióticos que pueden ser alterados por modificación de las condiciones ambientales.

Los microorganismos tienen la habilidad para degradar una amplia variedad de compuestos químicos, de polisacáridos simples, aminoácidos, proteínas, lípidos, etc., hasta materiales más complejos tales como residuos de plantas, ceras, gomas, hidrocarburos (alifáticos, cíclicos y aromáticos), así como metales pesados y muchos compuestos xenobióticos (ver apartado IV-2)

Gran parte del éxito de los microorganismos en los habitats naturales es debido a que siempre hay forma de obtener energía, por ejemplo, las bacterias reductoras de nitratos acoplan la oxidación de compuestos orgánicos con agua para la reducción exergónica de nitritos vía N_2 o NH_3 . La energía deriva principalmente del transporte de electrones y fosforilación durante el proceso respiratorio del nitrato, y el carbono celular es derivado de la descomposición de los productos de compuestos orgánicos. Las bacterias reductoras de sulfatos acoplan la oxidación de compuestos orgánicos con el agua para la reducción exergónica del sulfato vía sulfito y sulfuro. La energía se deriva del transporte de electrones y fosforilación durante la reducción del sulfato.

El carbono celular deriva de la descomposición de las estructuras de los compuestos orgánicos. Los microorganismos reductores de sulfatos son los responsables de la degradación de materia orgánica en ambientes marinos que contienen aproximadamente 27 mM de sulfatos.

Los microorganismos fermentadores derivan su energía de la fosforilación a nivel de sustrato; los compuestos orgánicos sirven tanto de donadores como aceptores de electrones.

La metanogénesis bacteriana es un proceso común para muchos ecosistemas anoxigénicos. Este proceso estrictamente anaerobio está asociado con la descomposición de materia orgánica en sedimentos y lodos anoxigénicos, y en digestores de aguas de alcantarilla anaerobios. Las bacterias del metano tienen habilidad para usar solo unos pocos compuestos simples para mantener el crecimiento por medio de procesos simples como la metanogénesis a partir de CO_2 , metanol, ácido acético y fórmico.

La deshidroxilación reductiva o la deshalogenación, son a menudo usadas como reacciones para la producción de energía [37].

Cabe esperar por lo tanto, que las funciones de los microorganismos se modifiquen de manera importante según las sustancias químicas y las condiciones físicas del medio ambiente. La comprensión de las influencias ambientales ayudan a explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar métodos para controlar las funciones microbianas ya que no todos los microorganismos responden de la misma manera a un factor ambiental determinado; de hecho, una condición ambiental puede ser perjudicial para un microorganismo y benéfica para otro [17].

IV-1 BIODEGRADACION DE COMPUESTOS NATURALES

Las bacterias y los hongos heterótrofos hidrolizan los compuestos orgánicos para obtener los precursores destinados a construir su propia sustancia celular y la energía necesaria para los procesos vitales. A tal fin, los microorganismos transforman el material orgánico en compuestos de menor riqueza energética y, en determinadas condiciones, por último, en sustancias minerales.

En esta remineralización de los compuestos orgánicos reside la función principal de las bacterias y los hongos en el equilibrio material de las aguas y el suelo. La remineralización completa se verifica únicamente, por regla general, en presencia de oxígeno, es decir, en condiciones aerobias. En cambio, esta degradación suele quedar incompleta en condiciones anaerobias.

Las sustancias atacables con facilidad (proteínas, polisacáridos, etc.) se descomponen en gran parte por oxidación, pero las más resistentes (grasas, celulosa y lignina) experimentan un aumento y contribuyen a formar el llamado humus con los productos parcialmente desdoblados. Por regla general e independiente del lugar, primero se descomponen los azúcares y las proteínas, después el almidón y las grasas y finalmente los compuestos de elevado peso molecular, como la quitina, la celulosa, la lignina, etc.

Además, los microorganismos son capaces de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos, usándolos como abastecimiento de energía. La variedad de mecanismos bioquímicos requeridos para este proceso es considerablemente pequeña, ya que un microorganismo lleva a cabo la degradación de diversos materiales con un mismo mecanismo, y los productos finales llegan a ser los mismos. Algunas sustancias orgánicas que degradan los microorganismos se describen a continuación [119,127]:

1.- PROTEINAS

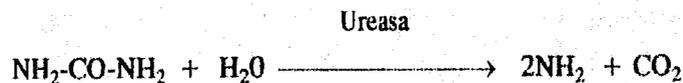
En el suelo y el agua es particularmente elevado el número de bacterias proteolíticas, las cuales utilizan las proteínas como alimento. Hay muchas especies representantes de pseudomonas y otras eubacterias así como diversos hongos, que tienen capacidad para llevar a cabo la proteólisis. Los microorganismos utilizan primeramente exoenzimas proteolíticas para hidrolizar las proteínas,

después las peptidasas descomponen los polipéptidos y oligopéptidos utilizados por las células, para convertirlos en aminoácidos. Estos tienen aplicación para la síntesis de las proteínas celulares propias o bien sufren una desaminación. En tal caso se libera amoníaco. De aquí que el proceso se conozca como desaminación. En medio anaerobio puede producirse también la descarboxilación de los aminoácidos originándose aminas primarias y CO₂. El esqueleto carbonado sigue después descomponiéndose por distintas vías, según su estructura y los microorganismos participantes en el proceso [77].

Como ya se mencionó, en la degradación proteica participan activamente diversos microorganismos entre los que destacan *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Proteus vulgaris*, *pseudomonas* y otros

2.- UREA

La urea llega también a las aguas con las deyecciones, donde un gran número de bacterias la convierten en amoníaco y CO₂ con ayuda de la ureasa. Se trata en este caso de un proceso de desaminación hidrolítica.



Si las bacterias que degradan la urea son muy abundantes, los iones de amonio inhiben la producción de ureasa para que cese la liberación de amoníaco y su cantidad quede reducida a la necesaria para la síntesis proteica. Esta inhibición de la producción enzimática no sucede con algunas bacterias, los llamados ureolíticos, como ocurre, por ejemplo, con las especies *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcinaureae*, *Proteus vulgaris*, y otros cuya presencia en las aguas residuales es bastante frecuente. De ahí que la urea existente se convierta con rapidez, en su totalidad, en amoníaco y CO₂, lo que puede traducirse en una elevación del valor del pH.

3.- ACIDO URICO

El ácido úrico es producido principalmente por aves y reptiles durante la proteólisis y puede ser a su vez descompuesto por una serie de bacterias que cuentan con la enzima uricasa. Las

bacterias que descomponen el ácido úrico, aisladas de las aguas costeras y continentales, pertenecen principalmente a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Alcaligenes* y *Nocardia*. En los sedimentos destaca el género *Streptomyces*.

4.- AZUCARES

Muchas eubacterias y gran número de actinomicetos y hongos son capaces de desdoblar los azúcares sencillos. En medio aerobio, las hexosas se convierten primeramente en compuestos tricarbónicos que se transforman en ácido pirúvico; después de la descarboxilación y a través del ciclo del ácido tricarbónico, se forma CO_2 por oxidación.

En medio anaerobio son posibles únicamente las fermentaciones. Entonces pueden originarse, según las circunstancias, alcoholes, ácidos orgánicos (láctico, butírico, propiónico, acético y fórmico), hidrógeno y CO_2 principalmente.

En contraste con los azúcares sencillos, algunos disacáridos muy difundidos en el mar (sacarosa, lactosa y maltosa) sólo son escindidos por un número muy escaso de especies bacterianas.

5.- MANITOL

Las algas pardas, liberan el manitol en las aguas, siendo importantes los géneros *Laminaria* y *Ecklonia*, pero lo pueden producir también las bacterias que fermentan la fructuosa y que originan a la vez lactatos, acetatos y CO_2 . El manitol sirve como alimento a algunas bacterias y levaduras (por ejemplo *Rhodotorula* y *Torulopsis*) y por eso se suele degradar con rapidez, a cuyo efecto se produce D-fructuosa antes de la oxidación. Según esto, es corriente observar también un incremento de los microorganismos que degraden el manitol donde existan algas pardas. La bacteria *Clostridium pasteurianum* puede fermentarlo en medio anaerobio para originar ácido butírico.

6.- ALMIDON

El almidón es una sustancia de reserva muy importante en las plantas. Numerosas especies de bacterias y hongos son capaces de desdoblarlo hidrolíticamente por medio de exoenzimas

(amilasas). Entonces se origina el disacárido maltosa, que la enzima maltasa lo hidroliza en glucosa.

El almidón vegetal está formado por dos glucanos amilosa (15-27%) y amilopectina. La amilosa es hidrosoluble y es responsable del color azul típico que adopta el almidón al tratarlo con yodo. Está formada por cadenas no ramificadas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos α en posición 1,4. La amilopectina también es una poli- α -1,4-D-glucosa que está ramificada al igual que el glucógeno en posición 1,5.

La degradación del almidón se produce generalmente con rapidez en los medios aerobios. Son responsables del proceso diversas especies de pseudomonas y del género *Bacillus*, (*B. macerans*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*) así como algunos actinomicetos y hongos como las especies *Aspergillus oryzae*, *A. niger* y *A. wentii*. Varias especies del género *Clostridium* lo desdoblan en los sedimentos anaerobios.

7.- CELULOSA

La celulosa es una sustancia que forma el almacén de la mayoría de las plantas y es muy abundante. Su proporción puede ser alta en el total de la materia existente en el sedimento de los lagos y estanques. Por tanto, los microorganismos que degradan celulosa revisten también una importancia considerable en las aguas del mismo modo que en la tierra. En medio aerobio la degradan principalmente mixobacterias y los hongos superiores (ascomicetos, hongos imperfectos). En la fermentación anaerobia de la celulosa se originan los siguientes productos: etanol, ácido formico, acético y láctico, hidrógeno y anhídrido carbónico.

En condiciones aeróbicas los hongos participan de forma esencial en la degradación de la celulosa, destacando los géneros *Fusarium* y *Chaetomium*. También son celulolíticos: *Aspergillus fumigatus* y *A. nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum* y *Myrothecium verrucaria*.

Entre los actinomicetos, sólo se han descrito unas pocas especies celulolíticas: *Micromonospora chalcea*, *Streptomyces cellulosa*, *Streptosporangium*.

En condiciones anaerobias la celulosa es degradada por los clostridios mesófilos y termófilos. La especie termófila *Clostridium thermocellum* tiene capacidad para degradar la celulosa.

8.- XILANOS

Los xilanos (hemicelulosa) son sustancias estromáticas y de reserva contenidas en muchas plantas y después de la celulosa es el carbohidrato más extendido en la naturaleza. Sobre ellos puede actuar mayor cantidad de microorganismos que sobre la celulosa. La especie *Clostridium tertium* degrada la hemicelulosa en medio anaerobio produciendo hidrógeno y CO₂ por medio de xilanasas.

9.- PECTINAS

Numerosas especies de bacterias y hongos escinden también las pectinas (poligalacturónidos). La propectinasa las disuelve y las pectinasas (pectinmetilesterasas) las desdoblan, produciéndose ácido pectínico y metanol. En medio anaerobio, los microorganismos que realizan principalmente esta función son los clostridios (por ejemplo: *Clostridium pectinovorum*).

Otras especies microbianas que tienen habilidad para degradar a las pectinas incluyen a *Bacillus macerans*, *B. polymyxa*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporium*, *Erwinia carotovora*.

10.- AGAR

El agar es un polisacárido que producen numerosas algas. Las más importantes son las algas marinas rojas de los géneros siguientes: *Ceramium*, *Gelidium*, *Gracilaria* y *Pterocladia*. Abundan mucho en algunas regiones del mar, donde constituyen la base de la obtención comercial del agar. Por consiguiente, en esas zonas marítimas hay un gran número de bacterias capaces de disolver este polisacárido por medio de una enzima específica llamada agarasa. Se trata a este respecto, sobre todo, de especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*,

Flavobacterium, *Agaribacterium*, *Bacillus* y *Cytophaga*. Estas bacterias se hallan principalmente formando colonizaciones superficiales sobre las más diversas algas.

11.- ACIDO ALGINICO

El ácido algínico o poliurónido es un producto de diversas algas pardas. La materia prima para la obtención industrial de los derivados de este ácido procede principalmente de la especie *Macrocystis pyrifera*, de algunas del género *Laminaria* y además *Ascophyllum nodosum*. Esos compuestos se hallan en las proximidades de las algas citadas, tanto en el agua como en los sedimentos, donde algunas bacterias pueden desdoblarlos. Son frecuentes en particular las especies *Algynomonas alginovorus* y *A. alginica* y más rara, *A. fucicola*. Las dos últimas pueden también disociar al agar.

12.- QUITINA

La quitina (poliacetilglucosamina), sustancia estructural de animales y hongos inferiores, está muy difundida en las aguas y sus sedimentos. Los crustáceos, cuyo exoesqueleto consta principalmente de esta sustancia, suministran la cantidad más importante de ella. Algunas especies de bacterias y hongos la desdoblan muy activamente. Entre las primeras destacan, sobre todo, las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*. Como los animales con esqueleto de esta sustancia sirvan de alimento a muchos peces, en los órganos digestivos de éstos hay también bacterias quitinolíticas.

En las aguas hay asimismo hongos quitinolíticos. Uno de ellos es por ejemplo el ficomiceto *Karlingomyces asterocystis*. Se trata de un hongo quitinolítico estricto.

La escisión microbiana de la quitina se debe a exoenzimas (quitinasas). El proceso lleva consigo una producción escasa de N-acetilglucosamina, pero abundante de quitobiosa y quitotriosa, que después son desdobladas por la quitobiasa.

Otros géneros microbianos capaces de degradar quitina incluyen *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*.

13.- LIGNINA

La lignina es un componente importante de la madera, muy abundante en las aguas continentales y de las costas. Sin embargo, en los océanos escasea mucho. Se descompone con una lentitud mucho mayor que la celulosa y por eso puede aumentar enormemente su cantidad en los sedimentos de los pequeños lagos. La lignina no tiene una composición uniforme, sino que lo forman diversos constituyentes. Se trata de compuestos de fenilpropano, sobre todo de coniferol, sinapol y cumarol. Los componentes de fenilpropano están ligados entre sí múltiples veces por puentes de éteres y de C-C que son extraordinariamente resistentes a las enzimas.

La lignina es desdoblada en las aguas principalmente por hongos superiores. Así, en la madera sumergida se encuentran numerosos ascomicetos y hongos imperfectos que la descomponen. Entre los hongos que atacan primariamente la lignina se encuentran *Polystictus versicolor* y *Stereum hirsutum* además de *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum*, *Polyporus adustus* y *Armillaria mellea* que degradan también celulosa. Junto a las formas que escinden la celulosa, contribuyen a la destrucción de las construcciones de madera inmersa en las aguas. La descomposición de esta sustancia es muy difícil en medio anaerobio.

14.- GRASAS

Las grasas (ésteres de glicerina y de ácidos grasos) son compuestos de origen vegetal y animal. las desdoblan una serie de bacterias y hongos con auxilio de las lipasas. En los lagos no es extraño que se acumulen las grasas producidas principalmente por el plancton, formando una película superficial, donde pueden abundar las bacterias que los degradan las cuales tienen también capacidad para actuar sobre casi todo tipo de aceites y grasas. Las principales bacterias lipolíticas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Sarcina*, *Serratia* y *Bacillus*. En la hidrólisis se originan primeramente ácidos grasos y glicerina.

15.- CERAS

Las ceras (ésteres de ácidos orgánicos como los monoalcoholes) pueden ser desintegradas igualmente por los microorganismos, aunque con mayor lentitud casi siempre que las grasas. Las Micobacterias tienen capacidad para degradar este tipo de compuestos.

16.- ACIDOS GRASOS

Los ácidos grasos resultan no sólo del desdoblamiento de las grasas y ceras, sino también de diversos procesos fermentativos. Se producen grandes cantidades de ellos, sobre todo, en la descomposición anaerobia de la celulosa. Sobre los ácidos grasos pueden actuar las bacterias y hongos en determinadas condiciones, produciéndose entonces metano y CO_2 en medio anaerobio. Un pequeño grupo de bacterias anaerobias estrictas tienen capacidad para esta fermentación metánica. Se trata de varias especies de arqueobacterias de los géneros *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanogenium*, *Methanosarcina* y *Methanococcus*. Actúan como aceptores de hidrógeno tanto el CO_2 (también el CO en el caso de *Methanosarcina barkeri*) como los grupos CH_3 . Algunas de esas especies pueden reducir el CO_2 con hidrógeno molecular para formar metano.

17.- HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos llegan al agua de muchas formas. El metano se origina en los sedimentos en la descomposición anaerobia de los ácidos grasos y abunda mucho en el llamado gas de los pantanos. En pequeñas cantidades se forman también etano, propano y butano. Estos llegan a muchas aguas como consecuencia de la penetración del gas natural. Los hidrocarburos alifáticos y aromáticos de cadena larga proceden de las plantas y están contenidos principalmente en el petróleo, cuya presencia no es extraña en las aguas de las regiones petrolíferas, pero aparecen también en las demás como residuo de los barcos que lo vierten.

Los microorganismos pueden desintegrar casi todos los hidrocarburos bajo condiciones apropiadas. Hay bacterias que no actúan sobre los hidrocarburos de cadena larga, pero que oxidan generalmente el metano. La especie *Methanomonas (Pseudomonas) methanica* puede utilizarlo (o bien al metanol) como única fuente de carbono. La oxidación del metano pasa probablemente por las etapas de metanol, formaldehído y ácido fórmico para terminar en CO_2 .

Aparte de la especie *Methanomonas methanica*, hay otras bacterias capaces de oxidar este hidrocarburo, especialmente en los lagos donde su producción es muy activa. Además del género *Pseudomonas*, hay, sobre todo algunos actinomicetos que destacan como oxidantes del metano.

Los hidrocarburos alifáticos de cadena corta, como el etano, el propano y el butano son oxidados por algunas bacterias de distintos órdenes. Se trata principalmente de representantes de los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (eubacterias) y *Nocardia* (actinomicetos).

Los hidrocarburos alifáticos de cadena larga sufren el ataque de un mayor número de bacterias. Trátese principalmente pseudomonas, micrococos, corinebacterias y nocardias. Algunas levaduras del género *Candida* son capaces también de oxidar estos hidrocarburos. Ciertas bacterias oligocarbófilas pueden vivir solamente del vapor de petróleo de la superficie del agua.

La oxidación microbiana de las parafinas superiores se inicia en el último átomo de carbono y conduce a la formación de ácidos grasos pasando por la etapa de alcoholes parafínicos. Para ello es necesaria la presencia de oxígeno molecular. *Pseudomonas erythrea*, que utiliza los hidrocarburos alifáticos desde el hexano hasta la parafina líquida. La descomposición del octano se verifica normalmente a través del alcohol octílico y del aldehído y ácido caprílicos. Las pseudomonas oxidan generalmente los hidrocarburos alifáticos de forma completa, pero los micrococos y las nocardias originan productos intermedios.

Muchas bacterias, algunas levaduras y otros hongos descomponen también los hidrocarburos aromáticos. Entre las primeras destacan principalmente las representantes de los géneros de *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus* y *Nocardia*. En esta degradación se producen principalmente anillos aromáticos que portan casi exclusivamente grupos hidroxilos. Estos anillos se convierten después en ácidos alifáticos, para lo cual hace falta oxígeno molecular. Las oxigenasas catalizan la incorporación de éste elemento a la molécula del hidrocarburo.

Las bacterias oxidan diversos hidrocarburos sin que sean capaces de crecer a sus expensas. Para ello necesitan otras sustancias orgánicas que pueden ser igualmente hidrocarburos. Estas cooxidaciones son conocidas en los cicloalcanos e hidrocarburos clorados.

18.- FENOLES

Un pequeño grupo de bacterias y hongos actúan asimismo sobre los fenoles siempre que la concentración no supere los 2g/l. Otros principios nutritivos pueden influir en mayor o menor medida sobre la descomposición bacteriana de estos compuestos, por ejemplo, la glucosa inhibe la degradación del fenol por parte de *Pseudomonas fluorescens*, en tanto que la urea la favorece.

IV-1.1 BIODEGRADACION DE LA CELULOSA

Las plantas usan algunos de los carbohidratos que son formados durante la fijación del CO_2 para formar compuestos orgánicos complejos tales como la celulosa, que es un polímero de glucosa de cadena larga insoluble en agua {Figura IV.1} y forma parte de las estructuras celulares de plantas. La madera contiene normalmente 40 a 50% de celulosa, 20 a 30% de lignina y 10 a 30% de hemicelulosa.

Cuando las plantas mueren, estas sustancias complejas son degradadas por microorganismos del suelo.

En el subsuelo muchos sistemas de vegetación, tales como tierras forestales, la cantidad de material orgánico permanece aproximadamente con la misma composición de año a año. Esto es debido al balance establecido entre la cantidad de material de plantas muertas depositadas en el suelo y la capacidad de los microorganismos del suelo para degradar estos materiales.

La degradación de la celulosa ocurre bajo condiciones aerobias y anaerobias. Bajo condiciones aerobias varios hongos, así como poblaciones bacterianas aerobias y aerobias facultativas, están involucradas en actividades celulolíticas. Los productos principales de la degradación de la celulosa bajo condiciones aerobias son dióxido de carbono, agua y biomasa celular. Bajo condiciones anaerobias algunos miembros del género *Clostridium* parecen ser los más importantes fermentadores de celulosa. La fermentación anaerobia de la celulosa resulta en la producción de ácidos grasos de bajo peso molecular así como de dióxido de carbono, agua y biomasa celular.

Los hongos generalmente juegan un menor papel en la degradación de celulosa bajo condiciones anaerobias, ya que la fermentación produce menos energía por unidad de sustrato consumido que la respiración, la fermentación anaerobia bacteriana de la celulosa puede degradar grandes cantidades de celulosa en orden para generar biomasa celular.

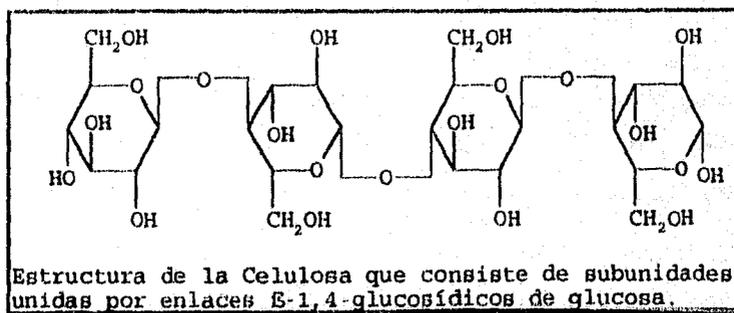
La degradación de la celulosa también ocurre a elevadas temperaturas, donde es llevada fuera del suelo por bacterias celulolíticas termófilas, tales como *Clostridium thermocellum*. La

degradación termoflica de la celulosa es importante en los procedimientos de composteo de residuos donde pueden ser estabilizadas grandes cantidades de celulosa.

La degradación de la celulosa es catalizada por celulasas. El sistema enzimático involucra diferentes tipos de celulasas que catalizan varias conversiones de la celulosa. Un sistema de celulasas involucra tres tipos de enzimas: una enzima C_1 , Una enzima C_x o β 1-4 glucanasa y una enzima β -glucosidasa. La degradación total de la celulosa involucra a las tres enzimas. La enzima C_1 actúa sobre la celulosa nativa y no parece exhibir mucha acción contra las moléculas de celulosa parcialmente degradadas. La enzima C_x no hidroliza la celulosa nativa pero en cambio rompe los polímeros parcialmente degradados. Hay dos tipos de ruptura exhibidos por la enzima C_x . La endo β 1-4 gluconasa rompe la cadena internamente, más o menos al azar, resultando en la formación de celobiosas y varios oligómeros. La exo β 1-4 glucanasa ataca al polímero cerca del final de la cadena resultando, parcialmente, en la formación de celobiosas.

La degradación de la celobiosa y otros oligómeros relativamente pequeños, es catalizada por la β -glucosidasa, resultando en la formación de glucosa. En suma, la degradación de celulosa en el suelo y otros habitats es un proceso complejo que involucra múltiples sistemas enzimáticos. Las actividades celulolíticas son exhibidas por varias poblaciones microbianas; el grado de degradación de la celulosa y los productos formados dependen de la especie de microorganismos y las condiciones ambientales con los habitats individuales [4,111].

FIGURA IV.1



IV-1.2 BIODEGRADACION DE LA LIGNINA

La lignocelulosa forma aproximadamente el 95% de los productos de biomasa renovables de la tierra; cerca de una cuarta parte está formada por polímeros de la lignina. La lignina es relativamente inerte y es un componente estructural de las plantas y de algunos pastos. Junto con la celulosa y la hemicelulosa brinda fuerza y protección estructural [46].

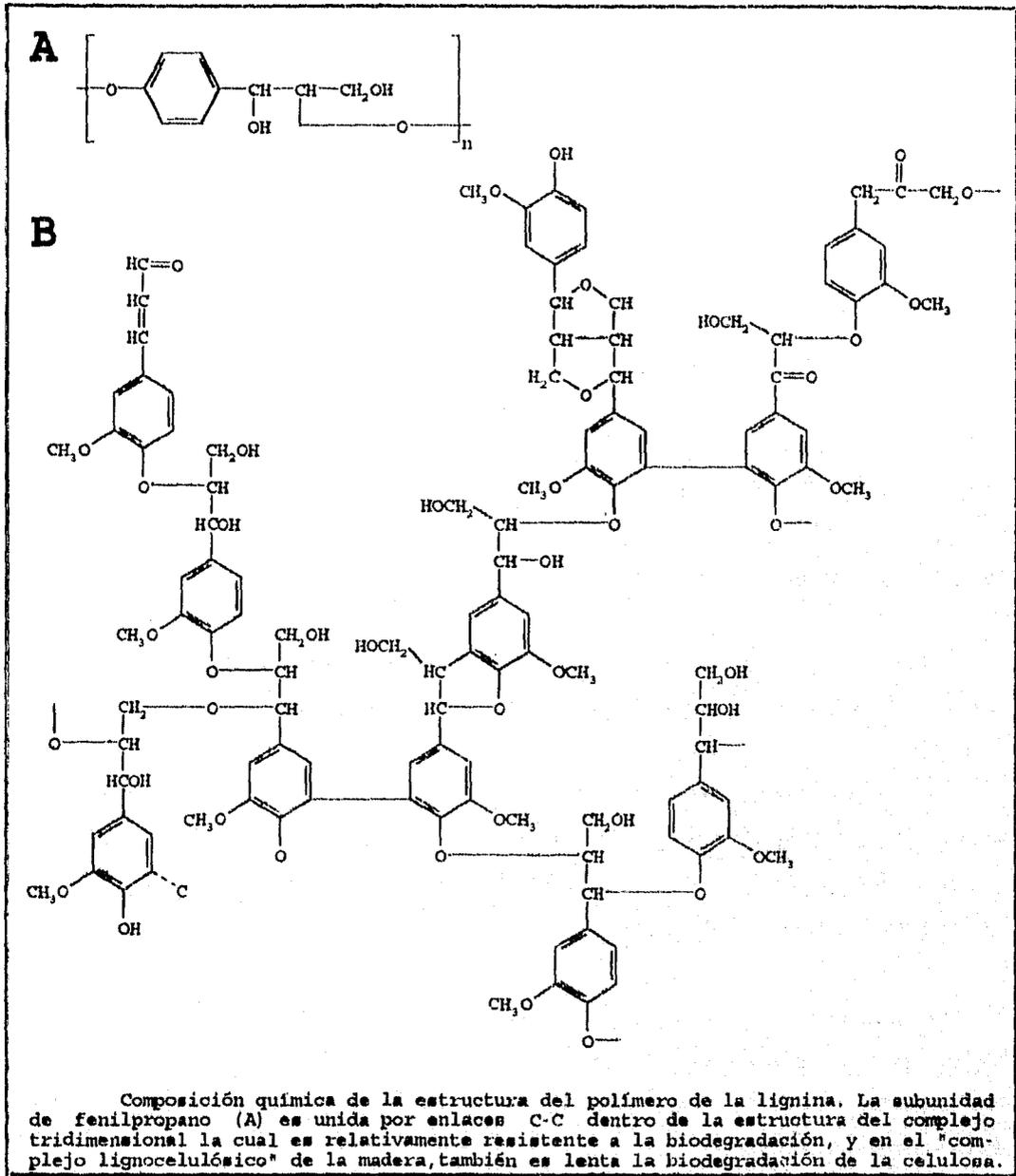
La lignina, tiene una estructura aromática que consiste en subunidades de fenilpropano, unidas juntas por enlaces carbono-carbono (C-C) o éter (C-O-C) unidos dentro de una estructura altamente compleja tridimensional {Figura IV.2}.

La biosíntesis de la lignina se hace a partir de fenilalanina. La desaminación, hidroxilación del anillo, metilación y reducción del carboxilo conduce al precursor de alcohol cinámico, el cual es polimerizado oxidativamente [5].

La proporción de lignina que se degrada es mucho más baja que la de la celulosa o hemicelulosa. La biodegradación de la lignina intacta no ocurre bajo condiciones anaerobias, aunque los fragmentos producidos por la degradación de la lignina pueden ser metabolizados anaerobicamente [149].

La madera intacta es atacada primero por hongos de la podedumbre café y blanca (basidiomicetos). El hongo de la podedumbre café, por un mecanismo que no está claro todavía, se desvía de la barrera protectora de la lignina y ataca directamente los componentes celulósicos y hemicelulósicos de la madera. Los troncos descompuestos por este mecanismo forman parte de un polvo café consistente principalmente de lignina liberada enzimáticamente. En contraste, el hongo de la podedumbre blanca degrada lignina preferentemente. El hongo de la podedumbre blanca y el hongo de la podedumbre café están taxonómicamente relacionados en forma estrecha y usualmente trabajan secuencial o simultáneamente, llevando casi a la completa degradación de la madera. La biodegradación de la lignina es un proceso altamente oxidativo.

FIGURA IV.2



El hongo de la pobredumbre blanca más extensamente estudiado por su actividad de biodegradación de la lignina, es el basiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* que produce agentes oxidantes tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (-OH) y oxígeno (O_2) [5].

La enzima extracelular que produce el hongo *P. chrysosporium* degrada a la lignina en presencia de peróxido de hidrógeno. Esta peroxidasa reacciona con el H_2O_2 para producir un catión radical oxo-Fe(IV)-porfirina, que es una especie altamente reactiva que remueve un electrón de uno de los muchos anillos oxigenados de la lignina, formando un radical aromático. Estos radicales causan la fragmentación de una cadena lateral (ruptura C-C), lo cual conduce a la desintegración del polímero [46].

La lignina no sirve como fuente de carbono y energía para *P. chrysosporium*. La actividad ligninolítica es inducida en un estado tardío del crecimiento y usualmente bajo condiciones limitantes de nitrógeno. Así, la biodegradación de la lignina parece ser un metabolismo secundario o un evento idiofásico.

Otros hongos implicados en la biodegradación de la lignina son *Polyporus*, *Poria*, *Fomes*, *Agaricus*, *Pleurotus*, *Collybia*, *Schizophyllum* y *Fusarium*. Los géneros de las bacterias aerobias que participan en la biodegradación de la lignina son *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* [5].

También se ha reportado que el hongo *Penicillium chrysogenum* puede mineralizar parte de la lignina a CO_2 formando algunos intermediarios insolubles no reportados [121].

La despolimerización de la lignina resulta en una variedad de fenoles, ácidos aromáticos y alcoholes aromáticos. Algunos de estos son mineralizados a CO_2 y H_2O , pero algunos de los productos, particularmente los intermediarios fenólicos de la biodegradación, pueden llegar a formar compuestos húmicos.

Esta repolimerización es, en parte, una reacción oxidativa espontánea y, en parte, una catálisis por polifenoloxidasas microbianas y lacasas. El aparente beneficio para los microorganismos que catalizan tales reacciones es la destoxificación de los dañinos intermediarios fenólicos.

Solo una porción del suelo húmico es derivado de los productos de la biodegradación de la lignina; otros numerosos compuestos aromáticos y compuestos orgánicos no aromáticos, derivados de plantas, animales y microorganismos, participan en la formación del humus [5].

IV-1.3 BIODEGRADACIÓN DEL PETRÓLEO Y CARBÓN MINERAL

La biodegradación está presente en forma natural en todos los suelos. Un gran número de bacterias, mohos, levaduras y ciertos tipos de cianobacterias están involucrados en la oxidación aerobia de los hidrocarburos del petróleo. Los nutrientes son necesarios para optimizar este proceso natural. El tipo y cantidad de nutrientes depende de la composición natural del suelo y la concentración de contaminantes [71].

Los microorganismos también participan activamente en la limpieza de las aguas contaminadas con petróleo. En ellas abundan las bacterias que degradan hidrocarburos y a veces también los correspondientes hongos [119].

Para tener mejor idea de la variedad metabólica de los microorganismos que degradan el petróleo crudo, hay que recordar que sus principales componentes son:

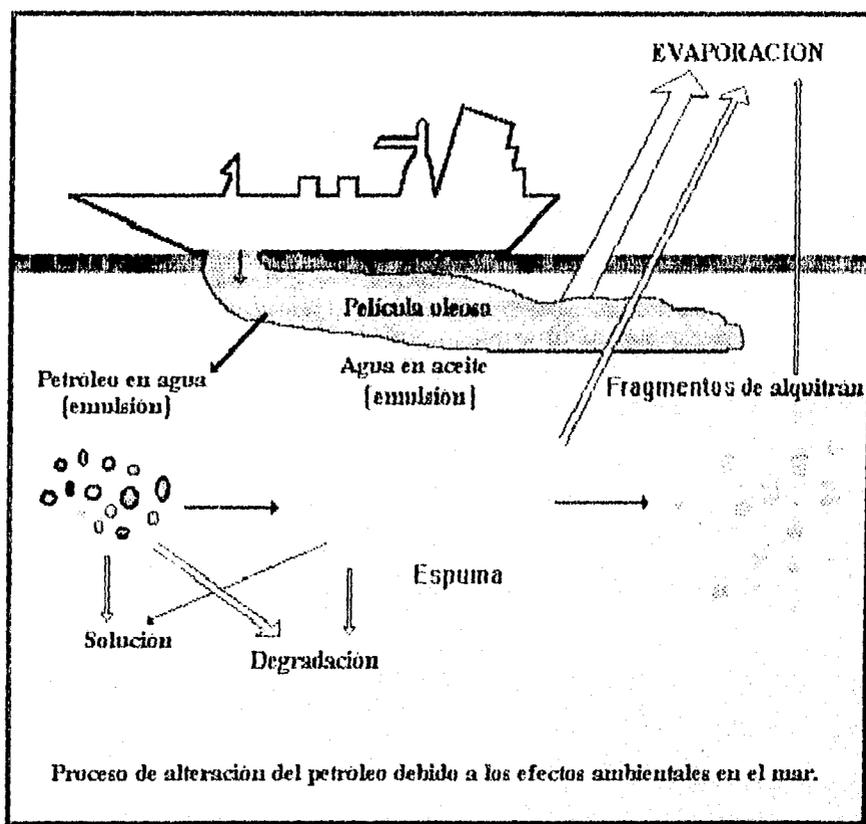
- n-alcenos, 15-30%
- cicloalcenos, 30-50%
- compuestos aromáticos, 5-20%
- compuestos aromáticos que contienen oxígeno, azufre o nitrógeno, 2-15%

Entre estos compuestos, hay algunos muy volátiles (con punto de ebullición de menos de 200°C), que se evaporan y los compuestos aromáticos de bajo punto de ebullición que se disuelven fácilmente en el agua [150].

Del petróleo se obtienen tres fracciones orgánicas principales: alcanos, cicloalcenos y compuestos aromáticos. Las olefinas están prácticamente ausentes en el petróleo crudo, pero son abundantes en muchos de los productos del petróleo. Los hidrocarburos aromáticos más comunes son: naftaleno, bencenos alquil sustituidos, fenantreno, pireno, fluorantreno, benzo(a)antraceno, criseno, trifenileno, benzo(g,h,i)-fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(e)pirileno y benzo(g,h,i)pirileno; además de los compuestos que contienen azufre, nitrógeno y oxígeno (piridina, quinolina, sulfuros, tioles, tiofenos, pirroles, fenoles, cetonas, ésteres y alcoholes entre otros) [109].

Los derrames de petróleo significan un problema inherente a su transportación {Figura IV.3}. Cuando esto llega a ocurrir, no sólo hay destrucción de los habitats acuáticos sino que también crean un gran problema para los habitantes locales (cuando el derrame ocurre en líneas costeras) seguido de un largo periodo de devastación del medio ambiente [48].

FIGURA IV.3



En 1971 se estimó que 12 millones de toneladas de petróleo contaminaban cada año los ambientes marinos como resultado de los derrames por tanques o pozos o como resultado de la limpieza de tanques. Pero el hecho de que los derrames de petróleo desaparezcan eventualmente de las aguas, del suelo alrededor de las refinerías, de líneas de tubería rotas y playas contaminadas es una clara evidencia de que los microorganismos pueden descomponer estos hidrocarburos [150]

El petróleo crudo se degrada con gran rapidez en el mar, sobre todo a causa de procesos físicos. Los componentes ligeros se volatilizan de 8 a 14 días, de tal manera que permanecen casi

exclusivamente los no volátiles, los cuales se mezclan con el agua del mar formando una suspensión pastosa de color pardo [119].

Algunas especies de *Corynebacterium* son capaces de oxidar parafinas en una forma comparable al catabolismo de los ácidos grasos a acetyl CoA. Cepas de *Pseudomonas putida* de habitats acuáticos y terrestres pueden oxidar benceno, tolueno, etilbenceno, octano, naftaleno y salicilatos como única fuente de carbono. algunos plásmidos metabólicos controlan muchas enzimas degradadoras de hidrocarburos en estos organismos [150]

En la lucha contra la contaminación petrolífera se han empleado a menudo surfactante artificiales, pero estos causan mayores problemas de contaminación en aguas costeras poco profundas, debido a su toxicidad y persistencia, además de que pueden frenar el crecimiento bacteriano. Sin embargo, hay microorganismos que pueden emulsificar al petróleo facilitando su degradación, tal es el caso de la especie de *Pseudomonas aeruginosa* que produce un glicolípido capaz de reducir la tensión superficial de la interface petróleo-agua y actuar como un potente surfactante, con la ventaja de no ser tóxico [119,60,84].

La levadura *Candida tropicalis* produce material de pared celular de mananas y ácidos grasos los cuales contribuyen a la formación de gotitas de petróleo (emulsificación), para facilitar la penetración a la célula [150].

La mayoría de los biosurfactantes son producidos por bacterias. Son generalmente metabolitos microbianos con la típica estructura anfibólica de un surfactante, en donde la porción hidrofóbica es un ácido graso de cadena corta, un hidroxilípido o un alfa-alkil-beta-hidroxi-lípido; la porción hidrofílica puede ser un carbohidrato, un aminoácido, un péptido cíclico, un fosfato, un ácido carboxílico, un alcohol, etc. Las propiedades físicas y químicas, reducción de la tensión superficial y estabilidad de la emulsión formada es muy importante en la búsqueda para un biosurfactante potencial.

Los surfactantes sintéticos son usualmente clasificados de acuerdo a la naturaleza del grupo polar. Sin embargo, los surfactantes microbianos son comúnmente diferenciados en base a su naturaleza bioquímica y a la especie microbiana que lo producen {Tabla IV-1.1}.

TABLA IV-1.1

TIPO DE SURFACTANTE	EJEMPLO	ESPECIE MICROBIANA PRODUCTORA
A. GLICOLIPIDOS	Micolatos de trealosa	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthroacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i>
	Esteres de trealosa	<i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Micolatos de mono-, di-, y trisacáridos	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Arthroacter spp</i>
	Ramnoflipidos	<i>Pseudomonas spp</i>
	Soforoflipidos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Candida spp.</i>
B. FOSFOLIPIDOS Y ACIDOS GRASOS	Fosfolipidos y ácidos grasos	<i>Candida spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i>
	Fosfolipidos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus spp.</i>
C. LIPOPEPTIDOS Y LIPOPROTEINAS	Gramicidas	<i>Bacillus brevis</i>
	Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Cerolipina	<i>Gluconobacter cerinus</i>
	Ornitina-lípido	<i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
	Lisina-lípido	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i>
	Furfactina, subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
	Péptido-lípido	<i>Bacillus licheniformis</i>

TABLA IV-1.1
(Continuación)

D. SURFACTANTES POLIMERICOS	Lipoheteropolisacáridos	<i>Arthobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Heteropolisacáridos	<i>A. calcoaceticus</i> A2
	Mano-pretefnas	<i>S. cerevisiae</i>
	Polisacáridos-proteína	<i>Aerthobacter. calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i>
	Carbohidrato-proteína	<i>Candida petrophilum</i> <i>Endomycopsis lipolytica</i>
	Complejo mananas-lípido	<i>Candida tropicalis</i>
	Manosa/eritrosa-lípido	<i>Schizomella melanogramma</i> <i>Ustilago maydis</i>
	Complejo carbohidrato-proteína-lípido	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>
E. BIOSURFACTANTES PARTICULADOS	Vesículas de membrana	<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N
	Fimbrias	<i>A. calcoaceticus</i>
	Células totales	Variedad de microbios.

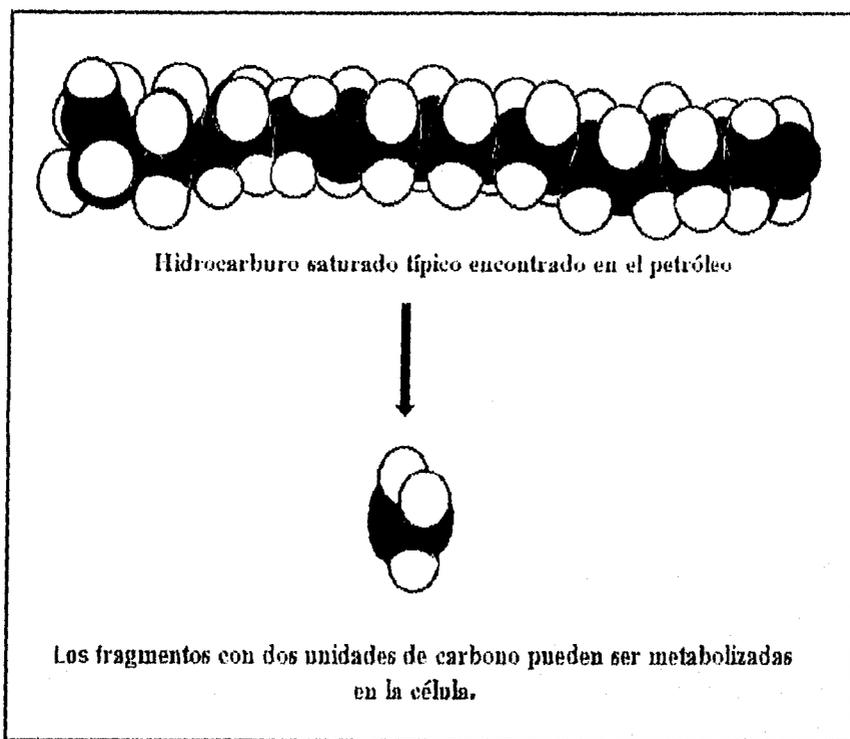
Muchos microorganismos parecen producir una mezcla compleja de biosurfactantes, particularmente durante su crecimiento en sustratos inmiscibles con agua.

Las principales clases de biosurfactantes incluyen (1)glicolípidos, (2)fosfolípidos y ácidos grasos, (3)lipopéptidos/lipoproteínas, (4)surfactantes poliméricos y (5)surfactantes particulados.

El interés en los biosurfactantes se ha incrementado considerablemente en los años recientes, debido a que son candidatos potenciales para muchas aplicaciones comerciales en la industria del petróleo, farmacéutica y procesamiento de alimentos [71].

El género *Pseudomonas* puede utilizar al petróleo como fuente de carbono y de energía. En presencia de aire, pueden remover dos unidades de carbono de una molécula grande de petróleo a un tiempo {Figura IV.4}.

FIGURA IV.4



Los microorganismos desdoblan casi siempre los componentes hidrosolubles del petróleo con gran rapidez, pero no pueden actuar más que en la superficie de éste líquido oleoso. Las bacterias son capaces de penetrar en él ciertamente, pero sin posibilidad de reproducirse en él. Su actividad depende de la temperatura y de la concentración de principios nutritivos (fosforados y nitrogenados), por eso la adición de éstos compuestos favorecen la descomposición microbiana del petróleo en las aguas oligotróficas [119].

Las bacterias degradan también lentamente el petróleo, para ayudar a la limpieza en los derrames petrolíferos. Por tal motivo, los científicos están siguiendo un camino simple para acelerar la degradación del petróleo sin recurrir a la ingeniería genética, y es el de adicionar nitrógeno y fósforo ordinario en las zonas de contaminación. Esta alternativa ha sido la del tratamiento con urea y fosfato de ocúlito con parafinas para producir un fertilizante de baja liberación. Esta alternativa parece ser prometedora en la acción microbiana contra la degradación del petróleo [139,150].

Especies de los géneros *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* y *Sarcina*, así como ciertas especies de hongos como *Apergillus* y *Monilia* pueden descomponer otro producto del petróleo, la gasolina, que ocasiona grandes problemas ambientales. En adición, la deterioración del asfalto de las carreteras y revestimiento de cañerías ha sido causado por especies de *Mycobacterium* y *Nocardia* [150].

IV-1.3.1 Desulfuración Microbiana de los Combustibles Fósiles.

La demanda de combustibles fósiles bajos en azufre y nitrógeno se ha intensificado debido a las regularizaciones cada vez mas estrictas de los estándares para reducir la emisión de contaminantes de los motores de combustión.

La primera objeción para el uso de los combustibles fósiles que contienen altas concentraciones de azufre y nitrógeno es la generación de óxidos de azufre y nitrógeno, los cuales pueden jugar un papel importante en la formación de depósitos de ácido (lluvia ácida). Si no es reducido, el depósito de ácido puede producir efectos perjudiciales duraderos en la agricultura, lagos, y reservas forestales. Los compuestos azufrados en el petróleo han sido implicados en la corrosión de oleoductos, y su eliminación puede requerir tiempo y costos considerables en los procesos de refinamiento del petróleo. El carbón mineral encara problemas similares.

La cantidad y tipo de sulfuros en los combustibles fósiles varía de la fuente y procedencia {Tabla IV-1.2} ya sea que se trate de carbón o de petróleo crudo:

TABLA IV-1.2

PETROLEO CRUDO		CARBON	
FUENTE	% DE AZUFRE	FUENTE	FUENTE
Kuwait	2.06	Francia	0.8 - 1.4
Medio Oriente	1.5 - 3.0	Países Bajos	1.0 - 3.0
Venezuela	1.7	Oeste de Alemania	1.3 - 1.5
Mississippi	1.6	Bélgica	0.5 - 4.5
Oeste de Texas	0.05 - 5.0	Polonia	0.5 - 2.8
California	1.0	Gran Bretaña	1.0 - 3.6
Canadá	0.44	India	6 - 8
Este de Texas	0.26	Oeste de los E.U.	0.2 - 7
Norte de Africa	0.18	Oriente de los E.U.	0.2 - 1
Lejano Oriente	0.10		

PETROLEO CRUDO.- El azufre contenido en el petróleo de diferentes fuentes varía de 0.025%-5%; se han identificado sulfatos, sulfitos, tiosulfatos tioles y sulfuros, además de más de 200 compuestos orgánicos de benzo y dibenzotiofenos. El azufre generalmente incrementa en la secuencia:

saturados < aromáticos < resinas ≤ asfaltenos

CARBON.- El contenido de azufre varía entre ≈0.5% a > 11%.

Mineral.-Formado de piritita o marcasita FeS_2 , sulfuro de plomo, zinc, y cobre, sulfatos como $CaSO_4 \cdot H_2O$. La piritita es la forma inorgánica predominante en el seno del carbón.

Orgánico.- Covalentemente unido a complejos en la matriz del carbón que incluyen tioles, mercaptanos, sulfuros, disulfuros y complejos de tiofeno [90].

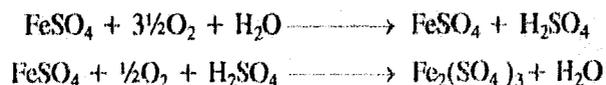
IV-1.3.1.1 Mecanismo de Desulfuración

El azufre contenido en los hidrocarburos constituye un factor refractario a su degradación física y microbiana.

El dibenzotiofeno (DBT) es oxidado por especies de *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, y *S.acidocaldarius*. La oxidación genera DBT-dihidrodiol y DBT-diol.

En la desulfurización del carbón, se ha estudiado con microorganismos Gram-negativos quimiolitótrofos como *Thiobacillus ferrooxidans*. Las reacciones involucradas han sido caracterizadas como mecanismos directos e indirectos por oxidación bacteriana del sustrato.

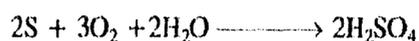
MECANISMO DIRECTO.- Requiere el contacto físico de la bacteria a las partículas de piritita, resultando en la oxidación localizada del sulfuro a sulfato y de ferroso a férrico:



Alternativamente, la solubilización del sustrato a través de la disociación puede ser requerida por los sistemas enzimáticos de los microorganismos. Estas reacciones generan hierro oxidado el cual participa en la oxidación no-biológica de la pirita, generando sulfato ferroso y azufre elemental:



MECANISMO INDIRECTO.- El papel de la bacteria es reoxidar el hierro ferroso a férrico. El azufre elemental es metabolizado por *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y otras bacterias ácido tolerantes para generar ácido sulfúrico:



La contribución de los dos mecanismos y la estequiometría de la oxidación de la pirita por *T. ferrooxidans* no queda clara. Esto es debido hasta cierto punto a la precipitación del hierro a sulfato como jarosita [$\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$], geotita (FeOH) y otros complejos insolubles de hidróxido de hierro, fosfatos y sulfitos. Muchos factores, incluyendo las clases y cantidades de bacterias presentes así como la naturaleza de la pirita y el carbón influyen significativamente los rendimientos de la reacción final. En general, la reacción total a menudo usada para ilustrar la solubilización de la pirita es:

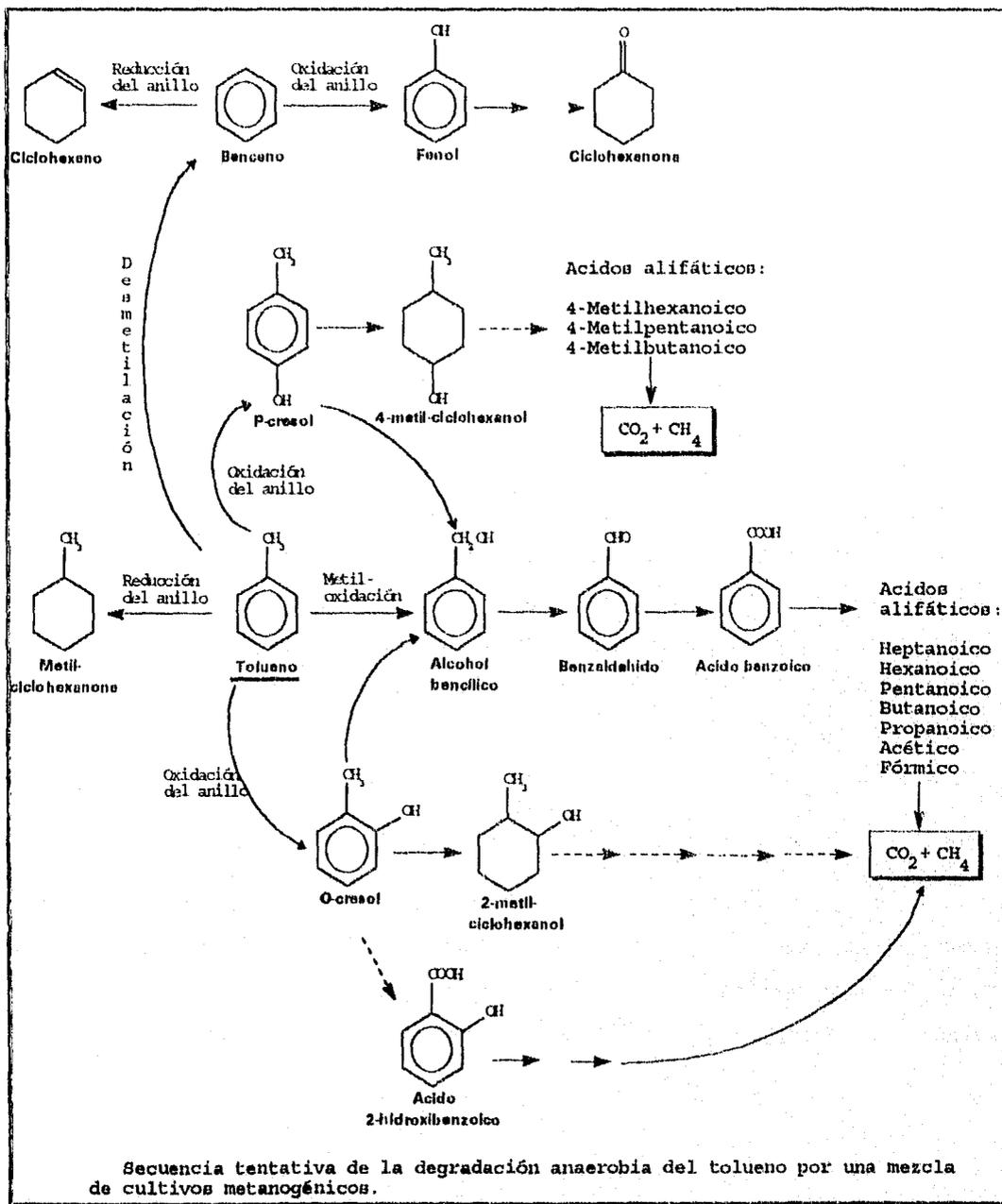


La producción de ácido sulfúrico por *T. ferrooxidans* y otras bacterias presenta un importante problema de contaminación que tiene un gran impacto en lagos locales. Hay compuestos que pueden inhibir aparentemente la oxidación bacteriana del hierro ferroso como son benzoato, sorbato y dodecil sulfato de sodio (SDS) a una concentración de 3-10 mg/l [90].

IV-1.3.2 Metabolismo de Hidrocarburos Aromáticos

Se ha reportado que el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos puede ocurrir bajo condiciones anaerobias {Figura IV.5}. Usando cromatografía de gases y otras técnicas que

FIGURA IV.5



involucran marcaje de sustratos, se pudo establecer que dicho metabolismo ocurre bajo las siguientes propuestas [46]:

- a) La incorporación de oxígeno en los productos hidroxilados proviene del agua.

- b) El tolueno es convertido a carboxilo y no a metano. Además, el anillo es convertido a CO₂.
- c) Los intermediarios aromáticos detectados cuando el cultivo microbiano fue alimentado con tolueno se identificaron como p-cresol, o-cresol (en pequeñas cantidades), alcohol bencílico, benzaldehído, benzoato, 2-hidroxibenzoato, benceno, y fenol; como productos cíclicos se encontraron el 2- y el 4-metilciclohexanol, metilciclohexanona, ciclohexanona y ciclohexano, y productos de ácidos alifáticos como el heptanoato, 4-metilhexanoato, hexanoato, 4-metilpentanoato, pentanoato, 2-metilbutanoato, butanoato, propanoato, acetato y formato.
- d) El benceno lleva a fenol como el principal metabolito aromático, seguido de ciclohexanoato y ácidos alifáticos, incluyendo propanoato.

IV-2 BIODEGRADACION DE COMPUESTOS SINTETICOS

Los productos químicos hechos por el hombre como refrigerantes, retardantes de la combustión, solventes, pinturas, herbicidas y plaguicidas, son causa de una considerable contaminación ambiental y de problemas de salud humana como resultado de su persistencia, toxicidad y en ocasiones transformación a otros metabolitos peligrosos [32].

Las aguas procedentes de los terrenos de aprovechamiento agrícola y forestal llevan abonos inorgánicos, productos antiparasitarios para cultivos y que mejoran el suelo. Entre ellos cabe destacar los insecticidas (por ejemplo el DDT), herbicidas (como el 2,4-D), que se emplean para combatir las malezas dicotiledóneas, sobre todo en cultivos de cereales y pastizales. Estas sustancias pueden ser utilizadas por las algas del plancton de las aguas continentales y costeras y se acumulan en la cadena alimenticia en tal cantidad que son capaces de producir daños a los últimos consumidores. Algunos de estos compuestos son también tóxicos para determinados microorganismos. Así, se ha observado una inhibición de la nitrificación acompañada de un estímulo de la amonificación y desnitrificación. De esta forma puede aumentar la concentración de amonio en las aguas afectadas hasta tal extremo que éstas resulten tóxicas para los organismos acuáticos superiores [119].

Algunos xenobióticos de estructura bazoica son relativamente recalcitrantes, requiriendo la participación del mundo microbiano para su eliminación [46].

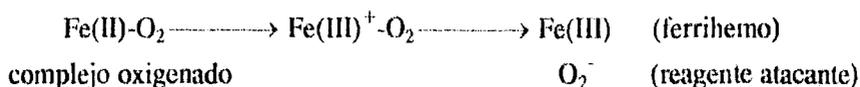
La importancia del catabolismo aromático es ahora más apreciado, ya que después de los residuos glucosilados, el anillo bencénico es una de las estructuras químicas más ampliamente distribuidas en la biósfera [39].

En presencia de oxígeno actúan generalmente las oxigenasas que se clasifican en dos grupos: a) las dioxigenasas y b) las monooxigenasas [39,37]:

A) DIOXIGENASAS:.- Las dioxigenasas catalizan la transferencia de dos átomos de oxígeno.

Algunas contienen Fe(II) pero no un enlace lábil con azufre. Típicamente constan de

cuatro subunidades con un peso molecular aproximado de 40 000 cada una. Algunas investigaciones han revelado que las dioxigenasas son activas cuando el hierro está en forma ferrosa, siendo la formación del complejo Fe(II)-O₂ un primer paso esencial para la asociación catalítica. Un mecanismo propuesto es el siguiente:



Sin embargo, otras investigaciones han revelado que existen dioxigenasas que son activas cuando contienen Fe(III) y éste permanece en forma oxidada durante la reacción.

Antes de que el anillo bencénico pueda ser abierto por una dioxigenasa, la estructura debe de adquirir dos grupos hidroxilo (hay excepciones pero son muy raras). Dichas dioxigenasas se han identificado como:

- 1) Dioxigenasas que realizan meta-fisión.- Llamada también protocatecol-4,5-dioxigenasa. Son menos coloridas y requieren ión ferroso. El ión ferroso en lugar del sustrato parece ser el sitio del ataque inicial por oxígeno.
 - 2) Dioxigenasa que realiza orto-fisión.- También llamada 3,4 dioxigenasa para catecoles. Son rojas ya que contienen un enlace muy fuerte con el ión férrico. El ión férrico permanece en la forma oxidada a través del ciclo catalítico y por lo tanto, parece unirse al sustrato aromático en un complejo quelante; el oxígeno ataca directamente al sustrato mientras está formando el complejo .
- B) MONOOXIGENASAS.- A las monooxigenasas también se les conoce como hidrolasas u oxidasas de función mixta. Catalizan la incorporación de un sólo átomo de oxígeno. Preparan al benceno para la fisión. Son flavoproteínas, en donde el FAD es primero reducido por el NAD(P)H; entonces el NAD⁺ deja el sitio activo antes de que el oxígeno entre al sitio activo para formar un hidroperóxido con el FAD reducido

Las monooxigenasas se clasifican como internas o externas. Las monooxigenasas que requieren un cosustrato en adición al sustrato hidroxilado

existente, son conocidas como monooxigenasas externas. Si el sustrato hidroxilado existente sirve también como cosustrato, entonces la monooxigenasa se clasifica como interna. Muchas monooxigenasas internas contienen flavinas como cofactores y están desprovistas de metales.

Una monooxigenasa bien caracterizada es la salicilato hidroxilasa. La enzima contiene un FAD y una cadena polipeptídica que tiene un peso molecular de 57 200 y exhibe una fuerte especificidad para sustratos que presentan un grupo sustituyente hidroxilo o carboxilo en la posición orto.

Las dioxigenasas y cicloisomerasas normales, exhiben una baja actividad para los sustratos halogenados [37].

El reconocer el hecho de que el ataque por oxígeno realiza un rápido recambio de diferentes materiales inertes (a menudo aromáticos), no implica que podemos ignorar los procesos anaerobios, los cuales también tienen una importante contribución en la operación del ciclo del carbono. Así, la deshalogenación reductiva es un paso importante que es catalizado por anaerobios [39].

Muchos microorganismos anaerobios pueden poseer capacidades para degradar algunos xenobióticos que son considerados recalcitrantes bajo condiciones aerobias. Numerosos estudios han revelado que los benzoatos sustituidos, incluyendo compuestos aromáticos halogenados, nitro y aminoaromáticos, hidrocarburos y compuestos fenólicos, pueden ser degradados por bacterias bajo condiciones anaerobias.

El grado del metabolismo anaerobio de compuestos orgánicos y su mineralización a CO_2 (y CH_4), depende de la disponibilidad de luz o aceptores inorgánicos de electrones tales como NO_3^- , SO_4^{2-} , o CO_2 [37].

Actualmente se conocen al menos cinco situaciones diferentes mediante las cuales se lleva a cabo el metabolismo del anillo aromático en ausencia de oxígeno molecular [37,117]:

- a) Por medio de fotometabolismo anaeróbico (o metabolismo fotosintético anaerobio).
- b) Bajo condiciones reductoras de nitratos en cultivos mixtos y con cepas simples de *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Moraxella sp.*

- c) Con sulfato como aceptor final de electrones.
- d) En asociación por medio de fermentación acoplada a metanogénesis.
- e) Por medio de fermentación.

Muchos xenobióticos ambientalmente importantes, introducidos por su uso industrial son halogenados, y la halogenación a menudo está implicada como una razón para la persistencia. Los compuestos orgánicos halogenados son usados como herbicidas, plastificantes, solventes y desengrasantes y por lo tanto, son los compuestos más estudiados.

Por conveniencia, la degradación de los compuestos recalcitrantes por microorganismos (bacterias y hongos principalmente) son agrupados en en tres clases [32]:

- 1) Alifáticos
- 2) Policíclicos
- 3) Aromáticos

La mayoría de los compuestos aromáticos son convertidos por bacterias a catecol y protocatecato {Figura IV.6}. El catecol y protocatecato se convierten rápidamente en sustratos por las subsecuentes reacciones de ruptura oxidativa. Por ejemplo, los compuestos aromáticos halogenados pueden ser convertidos a catecol, protocatecato o sus correspondientes clorocatecol y cloroprotocatecato.[7].

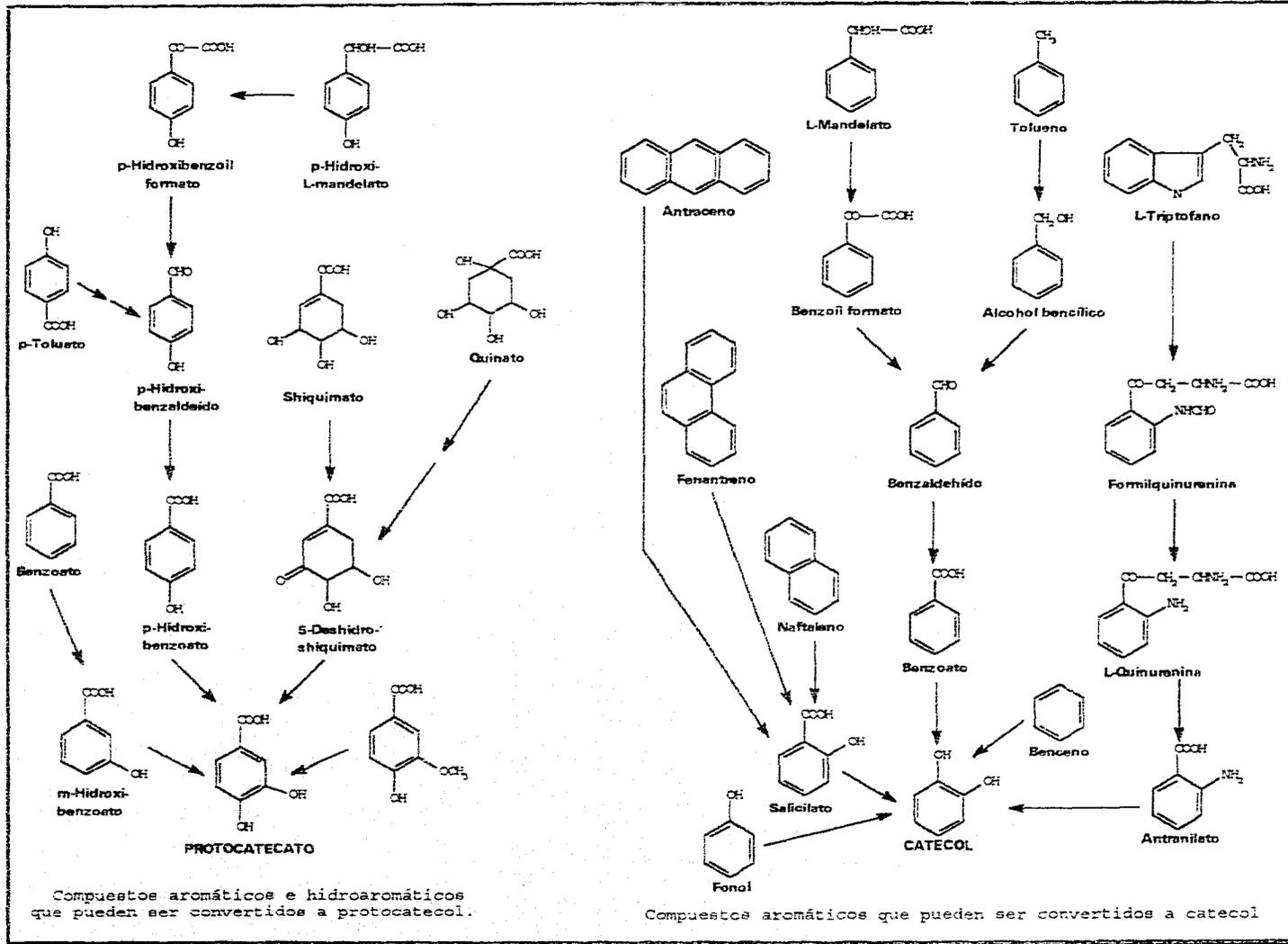


FIGURA IV.6

IV-2.1 XENOBIOTICOS

Un compuesto xenobiótico es un compuesto extraño a los organismos vivos, es decir, un compuesto no natural, producto de síntesis química, por lo cual constituye un reto para el metabolismo microbiano y que puede llegar a ser tóxico para plantas, animales y microorganismos, lo que hace que se considere a los xenobióticos como contaminantes.

IV-2.1.1 Xenobióticos Orgánicos

En términos de cantidad producida, diversidad y potencial de los efectos adversos en el medio ambiente, los más importantes tipos de compuestos xenobióticos son aquellos cuya estructura molecular está basada en un esqueleto carbonado. De las 65 clases de compuestos orgánicos que son considerados como peligrosos, 114 compuestos orgánicos han sido designados por la EPA como contaminantes prioritarios.

La industria agrícola es una importante fuente de xenobióticos orgánicos contaminantes en el sistema terrestre. Otras fuentes de xenobióticos orgánicos incluye depósitos de desechos en efluentes, depósitos de lodos, la industria petrolera, industria metalúrgica, la industria papelera y otras industrias de desechos no-agrícolas [62].

IV-2.1.2 Combustibles Fósiles

Los combustibles fósiles representan la fuente principal para la producción de compuestos químicos orgánicos. Su gran número y tipos hace que la predicción de su conducta en el suelo sea extremadamente difícil. Sin embargo se puede hacer una clasificación para facilitar un estudio sistemático de una amplia gama de compuestos orgánicos usando diferentes clases representativas {Tabla IV-2.1}. Esta clasificación está basada en las propiedades fisicoquímicas de los residuos orgánicos [62].

TABLAIV-2.1

CLASE DE COMPUESTO	COMPUESTOS REPRESENTATIVOS
Amina	Anilina, 1-Aminonaftaleno, 1-Aminoantraceno, 2-aminobenzo[a]antraceno.
Aromaticos básicos N-heterocfclicos	Piridina, Quinolina, Acridina, Benzo[a]acridina.
Fenoles	Fenol, 1-Naftol, 1-Hidroxiantraceno, 2-Hidroxibenzo[a]antraceno.
Aromaticos neutros N-heterocfclicos.	Indol, Carbazol, Benzo[c]carbazol.
Tiofenos	Benzo[b]tiofeno, dibenzo[b,d]tiofeno, Benzo[b]nafto(1,2-d)tiofeno.
Nitroaromáticos	Nitrobenceno, 1-Nitronaftaleno, 1-Nitroantraceno, 2-nitrobenzo[a]antraceno
Furanos	Benzo[b]furano, dibenzo[b,d]furano, benzo[b]nafto(1,2)furano
Hidrocarburos aromáticos neutros	Naftaleno, Antraceno, Benzo[a]antraceno

IV-2.1.3 Xenobióticos Inorgánicos

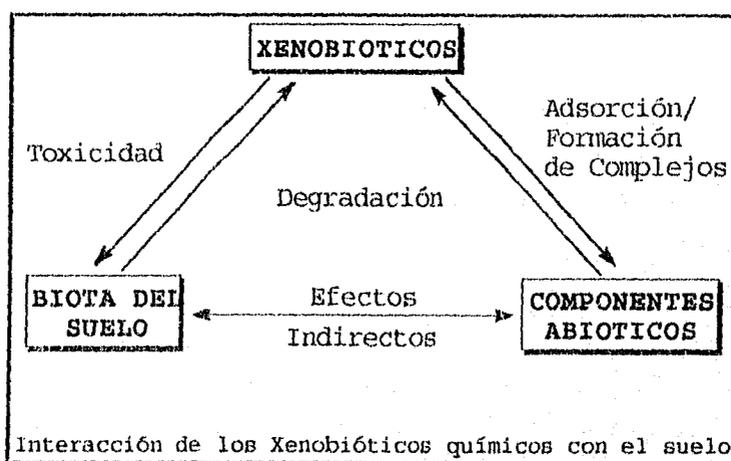
Muchos compuestos inorgánicos derivados de la industria como óxidos de azúfre y nitrógeno, pueden ser considerados xenobióticos porque se eleva su concentración al ser liberados y por los efectos deteriorantes que tienen en la biosfera. Los principales contaminantes son los metales pesados y los metaloides como son el arsénico, boro, cadmio, cromo, cobre, plomo, mercurio, germanio, molibdeno, níquel, selenio, estaño, vanadio, y zinc. Sin embargo, los compuestos contaminantes son muy diversos [62].

IV-2.1.4 Interacciones de los Xenobióticos con el Suelo

Cuando los xenobióticos son liberados en el suelo, estos pueden ser transportados, o químicamente modificados por procesos bióticos o abióticos.

La conducta del xenobiótico depende de las propiedades quimiodinámicas y de las propiedades físicas, biológicas, y químicas del suelo {Fig.IV.7}. La adsorción, lixiviación bioconcentración y volatilización son propiedades que afectan el transporte del compuesto original dentro del suelo, mientras que la hidrólisis, oxido-reducción, y otras transformaciones microbianas abióticas afectan su modificación. Sin embargo, estos procesos no suceden independientemente uno del otro, y el grado y extensión en el cual un proceso aparece gobierna el grado y extensión del otro proceso [8].

FIGURA IV.7



IV-2.1.5 Factores ambientales que afectan las interacciones entre Microorganismos y Xenobióticos

Las interacciones entre microorganismos y xenobióticos en el suelo están influenciadas por una gran variedad de factores ambientales, tales como [62]:

1.-ARCILLA Y MINERALES.- Su presencia tiene un efecto particular en la toxicidad de varios xenobióticos orgánicos e inorgánicos para los microorganismos. Los metales pesados

pueden ser adsorbidos en las arcillas reduciendo su concentración en el suelo y atenuando sus efectos adversos en las poblaciones microbianas.

2.-MATERIA ORGANICA.- Afecta la toxicidad del contaminante en forma que puede ser similar al efecto de la arcilla. La conducta de los xenobióticos orgánicos también puede ser alterado.

Por ejemplo, la materia orgánica soluble puede reducir la toxicidad de los metales pesados por quelación del metal reduciendo su disponibilidad para los microorganismos.

3.-pH.- Afecta la interacción entre el microorganismo y el xenobiótico de varias maneras. El pH afecta la conducta adsorptiva de los xenobióticos orgánicos e inorgánicos, incrementa su naturaleza catiónica lo cual incrementa su adsorción a arcillas y superficies orgánicas. Afecta la toxicidad y movilización de los metales y afecta el grado de formación de complejos.

4.- POTENCIAL REDOX.- Altera el estado de oxidación que determina la interacción microorganismo-xenobiótico por lo que afecta la toxicidad y el comportamiento ambiental del xenobiótico.

5.-TEMPERATURA.- Altera la toxicidad de algunos xenobióticos inorgánicos al afectar el grado de reacción, sin embargo, el efecto depende del compuesto en particular, p. ejem. la toxicidad del Cromo (III) para *Navicula seminulum* disminuye cuando la temperatura se incrementa de 22° a 30°C.

6.-INTERACCION ENTRE XENOBIOTICOS.- Es raro que se presenten, pero en caso de suceder se observan interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas, las cuales afectan de modo diferente al microorganismo que cuando se presenta un sólo compuesto.

IV-2.1.6 Plaguicidas

Entre los compuestos xenobióticos que merecen atención prioritaria están los plaguicidas ya que por su extenso uso y su estructura difícil de degradar en general, representan un importante factor de contaminación en el suelo y en el agua.

Los productos químicos agrícolas han sido usados desde tiempos antiguos; se sabe que los romanos usaron los vapores de la combustión del azufre para el control de los insectos. También utilizaron sal para mantener las hierbas bajo control. En el siglo IX los chinos usaron arsenico mezclado con agua para el control de insectos. Cerca de 1800, la piretrina y la rotenona se utilizaron como insecticidas para el control de muchas especies de insectos. El verde Paris, una mezcla de cobre y arsénico fue descubierta en 1865 y se uso para el control del escarabajo de la papa en Colorado. En 1862 un fungicida conocido como caldo Bordolés, hecho de una mezcla de cal y sulfato de cobre, se utilizó como fungicida para el control de la plaga de la uva. El óxido de mercurio fue usado en 1890 como un tratamiento para las semillas, y posteriormente, en 1915, el mercurio líquido fue usado como tratamiento para proteger las semillas de las enfermedades fúngicas.

El primer insecticida y herbicida orgánico sintético fue descubierto y producido al inicio de 1900; a esta producción de plaguicidas sintéticos procedió cientos de plaguicidas orgánicos sintéticos hasta 1940. Los hidrocarburos clorados entraron a la producción comercial en 1940 y los fosfatos orgánicos fueron comercialmente producidos durante 1950. Al final de 1950 las formulaciones con carbamatos se desarrollaron para insecticidas, herbicidas y fungicidas. En 1960 se desarrollaron plaguicidas específicos y más especializados. Muchas de estas nuevas familias de compuestos son biológicamente activos y son aplicados en el rango de gramos por metro cuadrado. Estos incluyen a las piretrinas, sulfonilureas e imidazoles, muchos de los compuestos más nuevos ofrecen gran seguridad para su uso en el medio ambiente. Actualmente existen mas de 600 plaguicidas químicos formulados dentro de 30,000 preparaciones comerciales. Aproximadamente 200 de estos 600 productos químicos básicos activos representan el 90% para uso agrícola en los Estados Unidos [11].

El uso de plaguicidas y herbicidas ha beneficiado a la sociedad moderna al mejorar la calidad y cantidad del suministro de alimento en el mundo, lo cual hace que la comida tenga un costo razonable. Sin embargo, el uso cada vez mayor de compuestos químicos ha logrado que se incremente el interés para recuperar el medio ambiente [37].

IV-2.1.6.1 Consideraciones Generales

Aunque los plaguicidas se han diseñado para destruir diversas plagas, son aplicados a un medio ambiente que incluye además cosechas, personas, y otros seres vivos, porque son esparcidos por el aire y tanto por su producción como por su diseminación también llegan a contaminar el agua.

Incuestionablemente, los plaguicidas continuarán ofreciendo un enorme beneficio a los humanos; ayudan a producir más alimentos y a proteger la salud. Los productos químicos sintéticos son la línea de defensa contra insectos destructivos, gusanos, hierbas que dañan las cosechas, enfermedades de plantas y roedores. A través del control de plagas hemos modificado nuestro ambiente para también complacer las demandas estéticas y recreativas.

Gran parte de la información del efecto que causan los plaguicidas en otros organismos se debe al estudio en aves, pescados e invertebrados marinos. Es claro que diferentes especies responden de diferentes formas a la misma concentración de un determinado plaguicida, por ejemplo, la reproducción es inhibida en algunos y en otros no; los huevos de algunas aves se hacen delgados y se rompen mientras que en otros no causan daño a las especies.

El interés público acerca del posible peligro de los plaguicidas está manifestado en acciones legales iniciadas por grupos de conservación. Los plaguicidas, como virtualmente muchos productos químicos, pueden tener efectos fisiológicos en otros organismos vivos en el medio ambiente incluyendo a los humanos. La mayoría de los plaguicidas no tienen efectos adversos directos sobre las personas, animales o el medio ambiente en general siempre y cuando se usen adecuadamente para el control de las plagas.

Los plaguicidas son un grupo de compuestos que incluye un número de productos químicos individuales diseñados específicamente para el control de ciertas plagas. Los plaguicidas más representativos incluyen a los siguientes:

- Fungicidas
- Insecticidas.
- Reguladores del crecimiento.
- Herbicidas.
- Silvicidas.
- Esterilizantes.
- Nematicidas.
- Rodenticidas.
- Algacidas.
- Atractantes.
- Moluscicidas.
- Avicidas.
- Acaricidas.
- Bactericidas.
- Desfoliantes.
- Repelentes.
- Piscicidas.
- Desecantes.

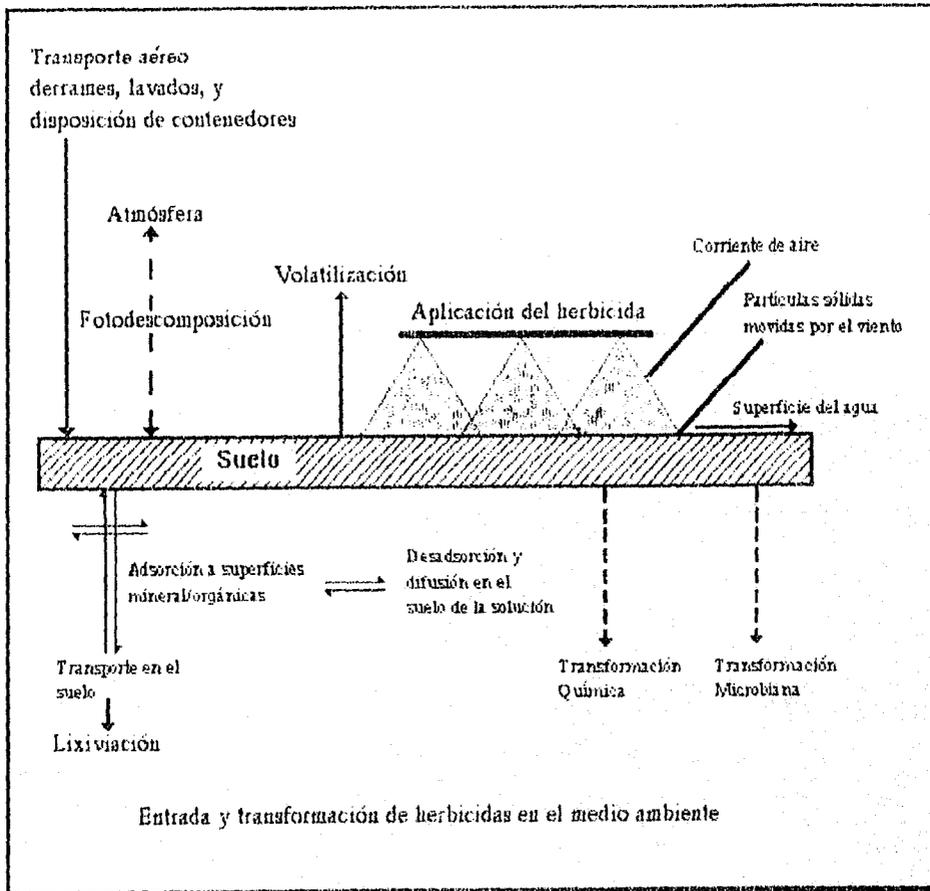
Como contraparte del efecto de los plaguicidas, los procesos biológicos y no-biológicos actúan juntos para degradar a los plaguicidas. En la naturaleza es difícil distinguir entre estos dos modos de degradación en muchos casos. A pesar de que algunas reacciones son claramente no-biológicas, tales como la fotólisis, otras, tales como la hidrólisis pueden ser debidas a procesos bióticos ó abióticos {Tabla IV-2.2} [37].

TABLA IV.2.2

REACCIONES QUE PUEDEN TRANSFORMAR COMPUESTOS QUIMICOS EN EL MEDIO AMBIENTE			
CATEGORIA	EJEMPLO	CATEGORIA	EJEMPLO
Fotólisis	Aldrin	Hidrólisis	Diazinon
Oxidación	2,4-D	Deshalogenación	Clorofenoles
Desaminación	Anilina	Descarboxilación	Bifenox
Metil-oxidación	Isopropinafta	Hidroxilación	Dicamba
Oxidación del azufre	Aldicarb	Reducción	DDT
Metabolismo Oxima	Aldicarb	Ruptura ester	Malathion
Ruptura C-N	Allaclor	Ruptura C-S	Benthicarb
Ruptura C-Hg	Etilmercurio	Ruptura S-N	Oryzalin

Los herbicidas entran en el suelo y en el agua como resultado de la aplicación directa y/o el escurrimiento de la superficie de las plantas, como una parte inherente del descargado vía aérea. La figura IV.8 ilustra las rutas de entrada de los herbicidas en el medio ambiente y algunas de las transformaciones que tienen lugar [115].

FIGURA IV.8



IV-2.1.7 Detergentes

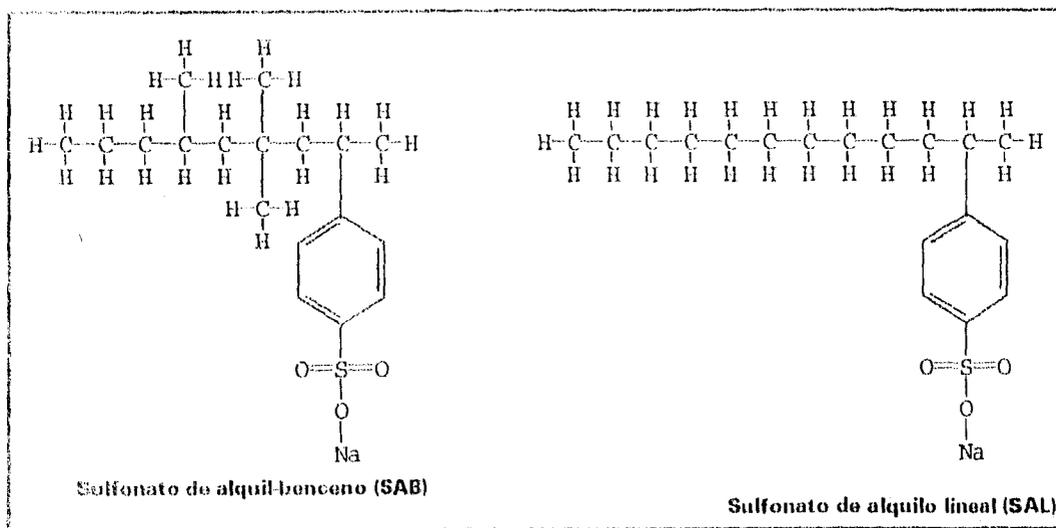
La utilización del jabón y del detergente para la higiene y la limpieza personal es común y de reconocida aceptación además, llega a decirse que su consumo representa una medida del avance cultural de los pueblos. Ciertamente, los adelantos de la humanidad al respecto durante los últimos 200 años suponen un origen científico de la práctica de la limpieza, sin embargo, las prácticas higiénicas y de limpieza actuales son más bien el resultado de una serie de consecuencias meramente fortuitas para la humanidad: a las sustancias destinadas para uso medicinal y religioso se les reconoció como aditivos para la limpieza del cuerpo y vestido. Las características y los usos de los jabones y detergentes se ha modificado con el tiempo, así como la diversidad y distinta naturaleza de las materias primas utilizadas [123].

En la década de 1950, los detergentes sintéticos fueron remplazando al jabón en el lavado de la ropa. Se obtuvo ropa mucho más limpia pero a un precio muy elevado: los detergentes no eran biodegradables. Los espumosos detergentes quedaron en la superficie de de los ríos y arroyos sin experimentar cambio alguno. De este modo, algunas poblaciones empezaron a notar que el agua tenía un sabor extraño y aspecto jabonoso.

Este problema causó gran interés entre los científicos, lo que propició el desarrollo de otro tipo de detergentes que fueran biodegradables. Estos detergentes contenían fosfatos en su estructura, lo que los hacía disponibles a los microorganismos que entonces podían utilizarlos como sustratos. Sin embargo, esto fomentó el crecimiento de algas las cuales gradualmente interrumpieron el curso de las aguas y, peor aún, consumieron el oxígeno necesario para los peces y otras formas de vida natural. Este desarrollo desmesurado de ciertas clases de vegetales, llamado eutrofización, ha ocasionado perjuicios casi irreparables en muchos lagos del mundo [44].

Desde 1965, la legislación en los Estados Unidos y en Gran Bretaña, han prohibido el uso de detergentes de sulfonatos de alquil-benceno (BAS) que no son biodegradables, o no los son fácilmente en favor de los jabones biodegradables de sulfonatos de alquilo lineal (LAS) {Figura IV.9}.

FIGURA IV.9



Los detergentes se fabrican formulados con un número de componentes, cada uno con una función específica durante el proceso de lavado. Todos los detergentes varían en su formulación, aunque generalmente contienen un grupo funcional básico. Muchas sustancias químicas incluidas en los detergentes típicos incluyen a las que se muestran en la Tabla IV-2.3

TABLA IV-2.3

SUSTANCIA	EJEMPLO	%	SUSTANCIA	EJEMPLO	%
Surfactantes	SAL	3-15	Blanqueador	Fosfonato	0.2 - 1.0
Dispersante	Tripolifosfato de sodio	0-30	Antiespumante	Etanolamida	1 - 5
Agente floculante	Acidos policarboxilicos	0 - 4	Enzimas	Proteasa Lipasas	0.3 - 1.0
Agente blanqueador	Perborato de sodio	15 - 35	Brillo óptico	Derivados de pirazolan	0.1 - 1.0
Intercambiador de iones	Zeolita tipo A	0 - 25	Inhibidor de la corrosión	Silicato de sodio	2 - 7
			Fragancia		0.05-0.3

Para incrementar la habilidad en el proceso de lavado por los detergentes LAS se adicionaron dispersantes en forma de polifosfatos tales como los tripolifosfatos de sodio (TPPS). Estos TPPS son muy inestables y se rompen en superfosfatos [57].

La molécula de detergente presenta una cadena polar alifática que es hidrofílica y una parte aromática que se caracteriza por ser hidrofóbica. A esta dualidad en la naturaleza de la molécula se deben las siguientes propiedades:

- a) Abatimiento de la tensión superficial.- Que se conoce como acción humectante.
- b) Separación y desintegración de partículas que se aglomeran en diversas superficies.-
Acción dispersante.
- c) Incorporación de dichas partículas al agua.- Acción emulsificante.

La principal diferencia entre los detergentes y los jabones es que los primeros no forman precipitados insolubles con iones como el Mg^{++} y el Ca^{++} presentes en las aguas duras, lo que significa que la eficacia de los detergentes en el proceso de lavado es mayor [146].

La presencia de detergentes aniónicos en algunas superficies acuáticas, es debida a la descarga de las aguas residuales industriales y domésticas. Dicha presencia aún en bajas concentraciones se ha visto que favorecen la absorción de sustancias nocivas o carcinogénicas a nivel digestivo concominadamente presentes en la fuente de manantiales [99].

IV-3 BIODEGRADACION DE COMPUESTOS ALIFATICOS

IV-3.1 COMPUESTOS ALIFATICOS HALOGENADOS

Los compuestos alifáticos halogenados están predominantemente contaminando mantos freáticos y son componentes significativos de desechos peligrosos y de lechos de tierras de relleno. Muchos compuestos alifáticos halogenados son liberados de fuentes industriales, comerciales y de la agricultura. Son alcanos y alquenos bromados o clorados que contienen uno o tres átomos de carbono, tales como los ácidos alcanoicos halogenados (HAA), haloalcanos, Tricloroetileno (TCE), y el dibromo etileno (EDB). Los etanos y eteres han sido comúnmente usados como refrigerantes, solventes en la limpieza en seco (metales y plásticos) y en la industria de barnices y en la manufactura de semiconductores. Su aparente peligro para la salud del ser humano inició la investigación concierne a su concentración en la superficie del agua y en el suelo.

El destino de los compuestos alifáticos clorados en el medio ambiente, depende de sus propiedades químicas particulares. El potencial químico y la transformación biológica ocurre bajo condiciones ambientales conocidas y controladas por el número y posición de los cloros sustituyentes. La tendencia general con respecto a la degradación de los compuestos alifáticos halogenados, es que entre más sustituyentes tenga la molécula, es más alto el grado de reducción y mientras menos halogenados, es más alto el grado de oxidación.

Aunque las transformaciones abióticas dentro de la escala del tiempo comunmente asociadas con movinientos de los mantos freáticos son lentas, los procesos bióticos típicamente proceden con mayor rapidez suponiendo que hay suficientes nutrientes y población microbiológica para mediar tales transformaciones.

La información genética y molecular en la biodegradación de estos compuestos por microorganismos acuáticos y terrestres, permite la construcción a través de las tecnologías de

DNA recombinante, de microorganismos que tendrán mejores capacidades degradativas que las que hacen las poblaciones naturales [32].

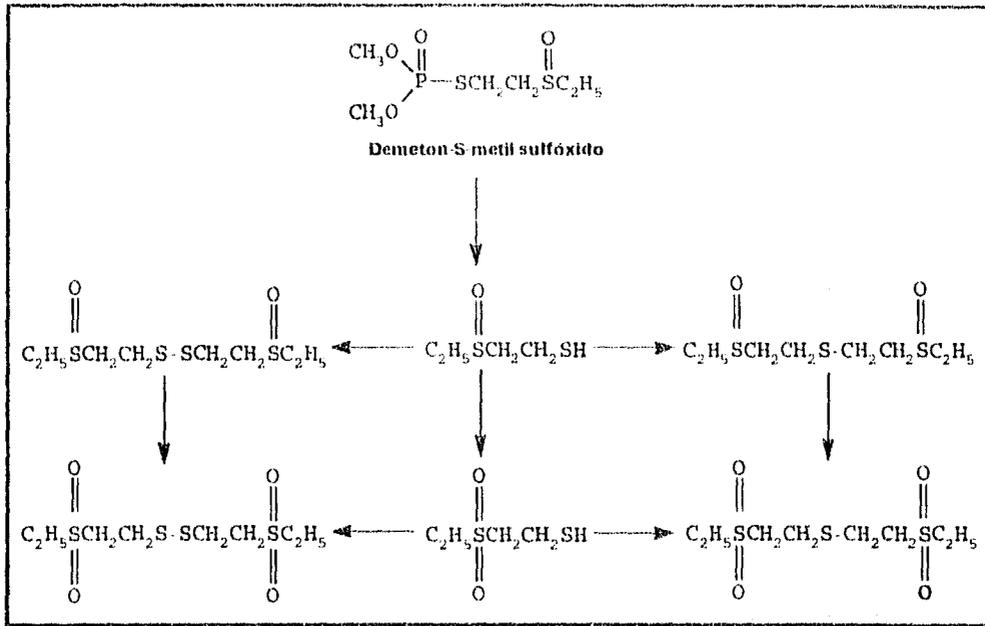
IV-3.1.1 Ácidos Alcanoicos Halogenados (HAA).- Diferentes microorganismos del suelo que sintetizan compuestos deshalogenados tienen también la capacidad para utilizar a los HAA. Algunas especies de *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, pueden crecer con ácido 2-monocloropropiónico y con ácido 2-monocloroacético; la degradación de estos compuestos depende del plásmido pUU204 (853kb) encontrado en dichas cepas y que codifica para cuatro diferentes deshalogenasas [32].

IV-3.1.2 Dibromo etileno (EDB).- El EDB se ha usado como un fumigante en suelos y en la gasolina como antidetonante. Debido a los grandes problemas ambientales que ha causado su uso, ha aumentado su investigación sobre su degradación en las últimas décadas.

Hay algunos reportes sobre su degradación en ambientes acuáticos, sin embargo, la información sobre los microorganismos involucrados y sus características genéticas involucradas en la degradación del EDB, no se informan [32, 112].

IV-3.1.3 Demeton S-metil-sulfóxido (Metasystox R).-Este compuesto es degradado por *Pseudomonas putida* 1453 por medio de la ruptura del enlace tioéster para formar tres compuestos principales: 2-(etilsulfinil)etanotiol, 2-(etilsulfonyl)etanotiol y bis[2-(etilsulfinil)etil]disulfuro {Figura IV.10}. *Nocardia* sp. DSM 43252 convierte el insecticida en otros tres metabolitos: bis[2-(etilsulfonyl)etil]disulfuro, bis[2-(etilsulfinil)etil]sulfuro y bis[2-(etilsulfonyl)etil]sulfuro vía oxidación, β -eliminación e hidrólisis. Otras bacterias que son capaces de metabolizar al demeton S-metil-sulfóxido, son *Arthrobacter* sp. DSM20398, *Arthrobacter roseopuraffineus*; *Corynebacterium petrophilum* ATCC 19080; *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 13745; *Bacillus sphaericus* ATCC 12123 y 123000; *Pseudomonas fragi* 1233 y *P. fluorescens* 1543 [2].

FIGURA IV.10



IV-3.1.4 Dimetilsulfuro (DMS).- El dimetilsulfuro (DMS) es el principal contribuyente de la emisión total de azufre de la tierra y del mar a la atmósfera. Las bacterias aerobias y anaerobias degradan DMS, pero su metabolismo por bacterias aerobias facultativas se ha descuidado.

Los microorganismos aerobios que catabolizan la degradación del DMS son hipomicrobios o tiobacilos. El mecanismo involucra la incorporación directa de oxígeno molecular dentro del grupo metilo del DMS y el CH_3SH . La ruta del metabolismo aerobio para el DMS se ha documentado mejor en hongos. El DMS es oxidado por una monooxigenasa dependiente de NADH a metanotiol y formaldehído:



La enzima metanotiol oxidasa se purificó de *Hyphomicrobium* cepa EG y de *Thiobacillus thioparus* TK-m y cataliza otra transformación dependiente de O_2 :

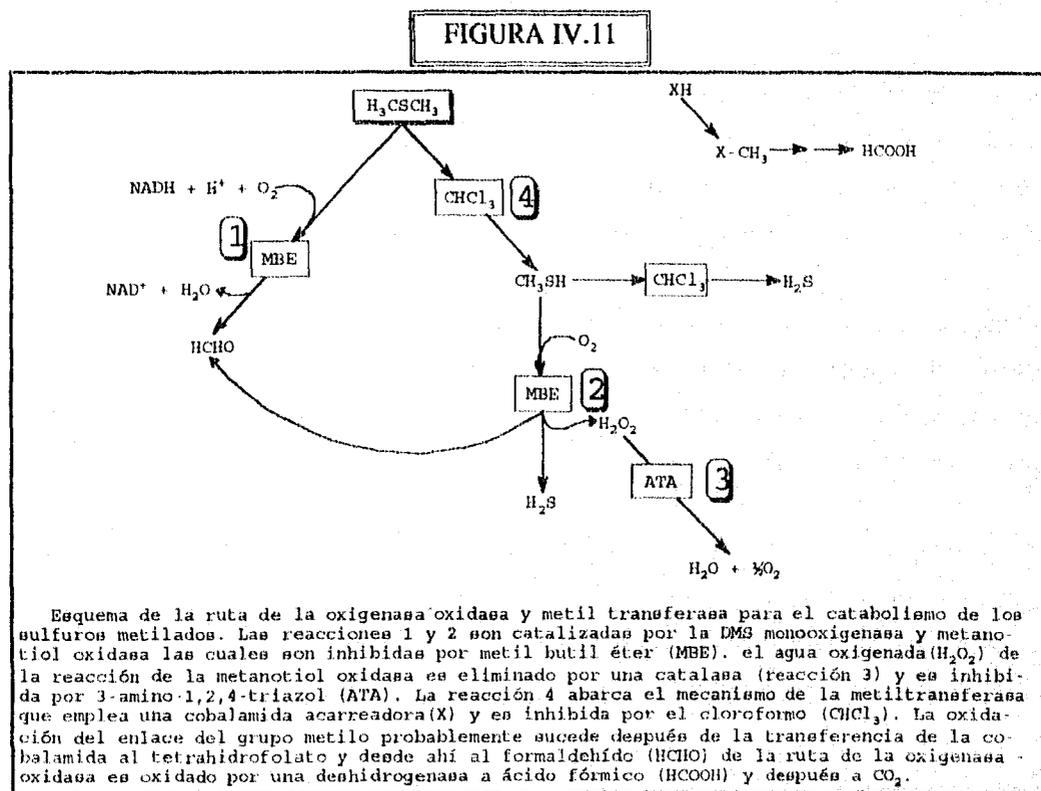


El H_2S es oxidado a sulfato y la protección contra el H_2O_2 tóxica que se produce es contrarrestada por una catalasa con alta actividad en ambas especies, *Thiobacillus* e *Hyphomicrobium*

Las condiciones anoxigénicas fluctuantes son comunes en muchos ambientes, y puede ser ventajoso para bacterias que degradan DMS por mecanismos bioquímicos similares en presencia o ausencia de O_2 , de este modo se evitan los procesos de adaptación e inducción.

Las enzimas DMS monooxigenasa y metanotiol oxidasa parecen ser inhibidas por el MBE (metil butil éter). La catalasa es inhibida por ATA (3-amino-1,2,4-triazol). En esta ruta no existen reacciones de transferencia de metilos.

La cepa *Thiobacillus* ASN-1, crece en condiciones desnitrificación con DMS. El metabolismo del DMS no requiere de oxígeno molecular como sustrato, sino que opera vía una metiltransferasa {Figura IV.11} la cual es inhibida por $CHCl_3$ pero no por MBE. Debido a que el O_2 no es un sustrato, esta ruta catabólica también permite crecer a la cepa en DMS con aceptores de electrones alternativos, tales como nitratos o nitritos.



La inhibición provocada por el CHCl_3 implica la existencia de una cobalamina acarreadora, la cual probablemente transfiere el grupo metilo al tetrahidofolato con la subsecuente oxidación del enlace de la unidad C_1 del formato.

La implicación ecológica del metabolismo del DMS por metil transferasas, más que por oxigenasas, es la facilidad del consumo de O_2 bajo concentraciones fluctuantes de éste, las cuales se encuentran típicamente en las interfases de sedimentos. Las evidencias sugieren que los sistemas de metil transferasas son más comunes en los ambientes naturales que las rutas oxigenasa-oxidasa [147].

IV-3.1.5 Tricloroetileno (TCE).- Los etenos clorados tales como el cloruro de vinilo, tricloroetileno (TCE), y el tetracloroetileno (percloroetileno) han sido frecuentemente detectados en los mantos acuíferos.

El TCE es uno de los principales solventes industriales usados para desengrasar y limpiar metales y componentes electrónicos. Estos compuestos son persistentes en el medio ambiente y son transportados rápidamente en las aguas freáticas. Su presencia en los mantos acuíferos es de interés público debido a su toxicidad y/o carcinogenicidad. La identificación de las condiciones que favorecen la biodegradación de los etenos clorados podría contribuir significativamente al esfuerzo para restaurar los mantos acuíferos.

Bajo condiciones anaerobias en el laboratorio, el TCE y el percloroetileno pueden ser degradados en condiciones metanogénicas mientras se hace crecer la cepa degradadora en medio con acetato. El percloroetileno es reductivamente deshalogenado a TCE, dicloroetileno y cloruro de vinilo, pero esta degradación es muy lenta.

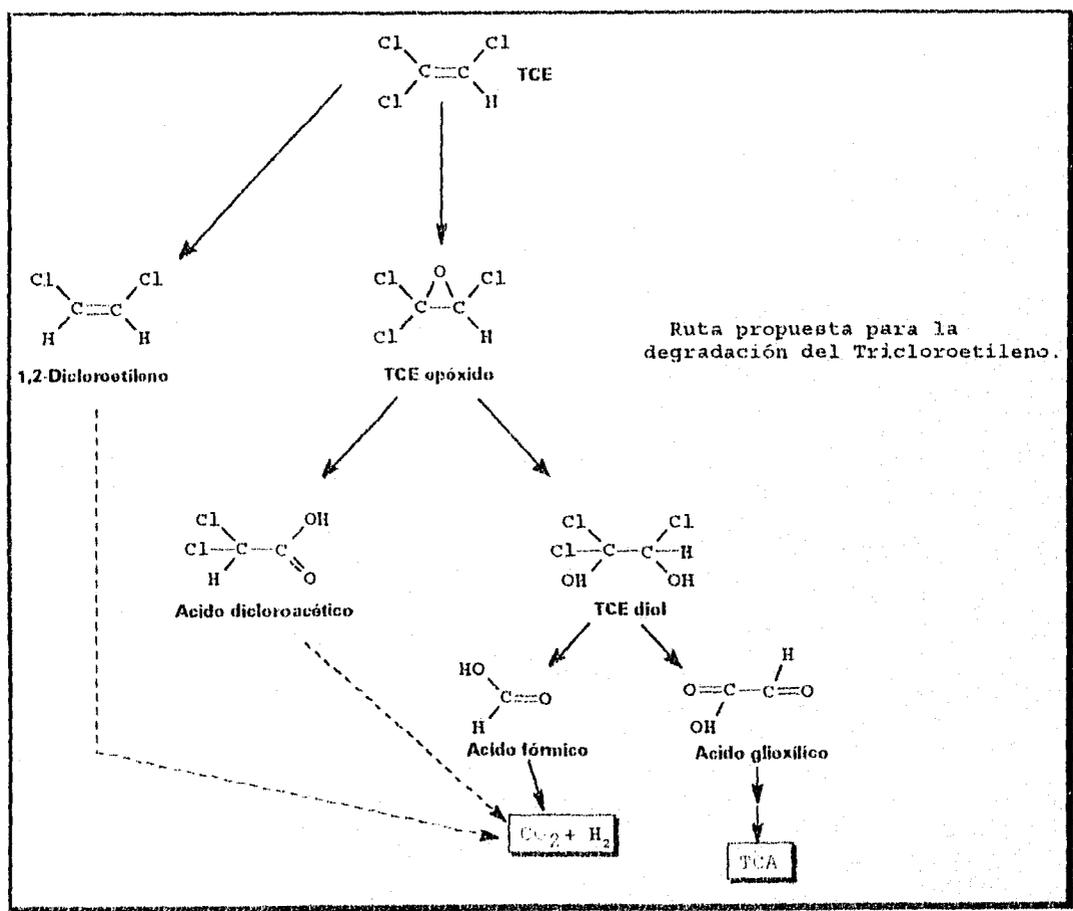
El TCE también puede ser metabolizado bajo condiciones aerobias; es mineralizado cuando la microflora del suelo es expuesta a gas natural en el aire, lo que implica la participación de metanotrofos en la degradación del TCE. Cuando se usa un medio líquido inoculado con bacterias que utilizan metano, el TCE se convierte a CO_2 .

Bajo estas condiciones, la degradación del TCE es inhibida por acetileno, que es un inhibidor específico de la oxidación del metano por metanotrofos lo que apoya la hipótesis de que la degradación del TCE es realizada por microorganismos metanotróficos. Bajo condiciones metanogénicas ambos, el TCE y el tetracloroetileno fueron convertidos a etileno.

La biodegradación del TCE por estas bacterias (metanotróficas), parece ser realizado a través de co-metabolismo. También se ha probado que la degradación del TCE es llevada a cabo cuando otros microorganismos aerobios crecen en presencia de fenol.

Las reacciones de degradación del TCE {Figura IV.12} tanto en condiciones anaerobias como aerobias, pueden ser importantes como un tratamiento potencial de los sitios contaminados vía estimulación de bacterias metanotróficas [32].

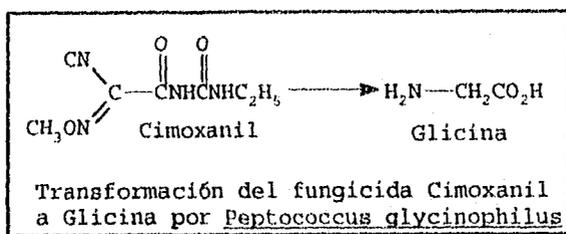
FIGURA IV.12



IV-3.2 OTROS COMPUESTOS ALIFATICOS

IV-3.2.1 Cymoxanil (Cruzate, DPX-3217).- El cymoxanil es un fungida usado en el control de la lama de la uva. La glicina se recupera como el producto principal de degradación de este compuesto por la bacteria *Peptococcus glycinophilus* {Figura IV.13 } [6].

FIGURA IV.13



IV-4 BIODEGRADACION DE COMPUESTOS HALOAROMATICOS

IV-4.1 METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS HALOAROMATICOS

Los compuestos aromáticos clorados, son los principales contaminantes ambientales, porque a menudo se liberan en grandes cantidades; son tóxicos y resistentes a la degradación, y se acumulan en sedimentos y en la biota. A pesar de que algunos compuestos son degradados lentamente por microorganismos acuáticos y terrestres, otros son degradados con relativa rapidez [32].

Los clorobencenos son usados principalmente como intermediarios en la síntesis de otros compuestos químicos y entran al medio ambiente a través de las aguas residuales de los sitios de producción. Se emplean en la industria eléctrica (transformadores, capacitores), en fluidos hidráulicos o de transferencia de calor y en otros usos diversos (plastificantes, componentes de pinturas y tintas, adhesivos, aditivos para aceites, auxiliares textiles y plaguicidas) [117].

La habilidad de los microorganismos aerobios para degradar los compuestos químicos clorados es a menudo limitada debido a que el grupo cloro de dichos compuestos, provoca un bloqueo del sitio activo de las enzimas, por lo cual, estos compuestos se vuelven recalcitrantes [137].

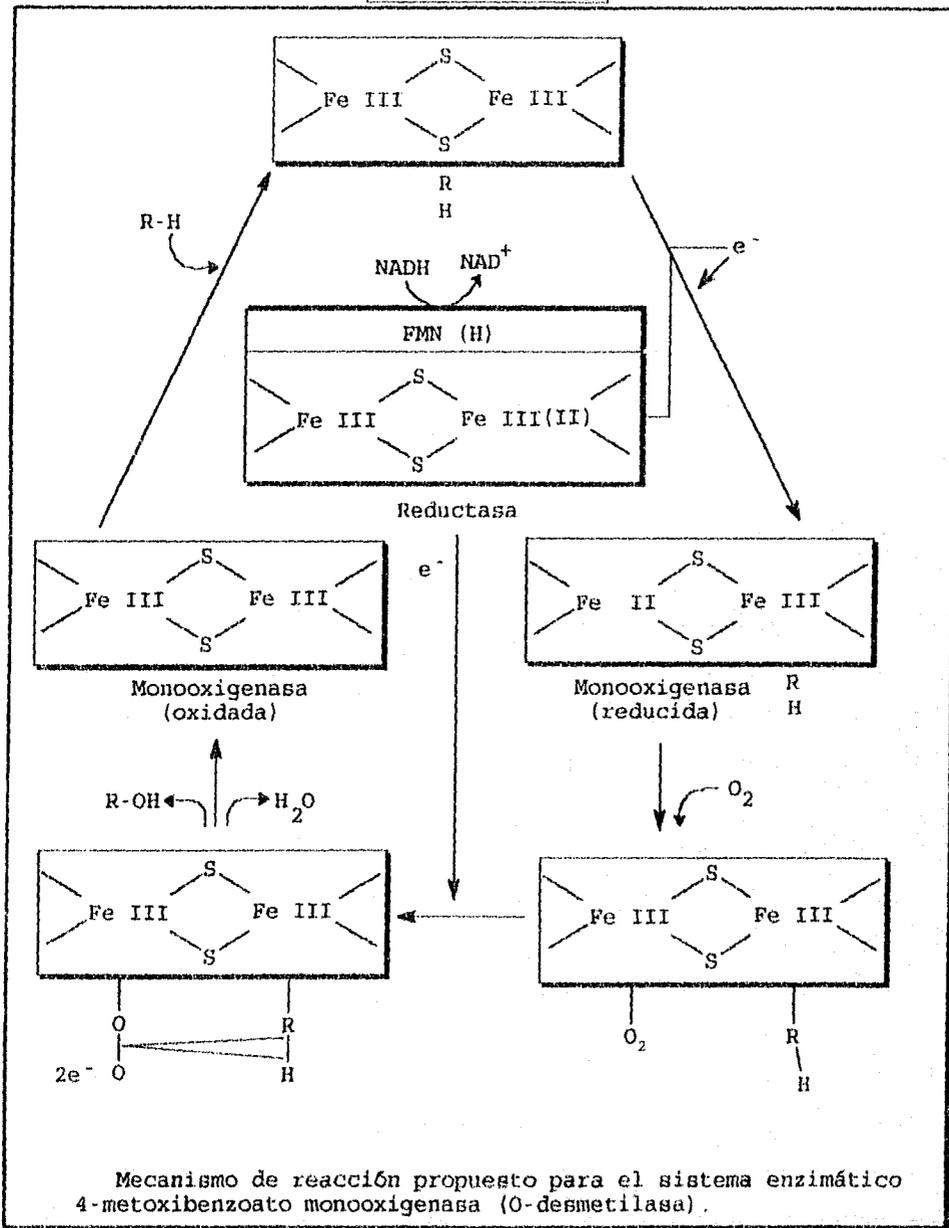
Dos procesos que son especialmente importantes en la degradación inicial de los compuestos cloroaromáticos son la desmetilación y la deshalogenación, además de la ruptura del anillo [37].

La biodegradación de los compuestos halogenados se considera completa cuando el esqueleto carbonado es convertido a intermediarios metabólicos y el grupo halogeno orgánico es regresado al estado mineral [117].

IV-4.1.1 Desmetilación.- La enzima 4-metoxibenzoato-o-desmetilasa es un sistema multienzimático que contiene hierro y una monooxigenasa con un enlace lábil de azufre. La enzima desmetilasa consiste de una reductasa dependiente de NADH y una monooxigenasa. La NADH-

reductasa contiene flavina mononucleótido (FMN) y un complejo hierro-azufre. El complejo hierro-azufre parece ser esencial para la función catalítica de la reductasa y puede mediar la transferencia de electrones del NADH a la monooxigenasa. La monooxigenasa parece ser un dímero que contiene un cromóforo hierro-azufre. Un mecanismo de acción propuesto para el sistema enzimático desmetilasa se presenta en la figura IV.14 [37].

FIGURA IV.14

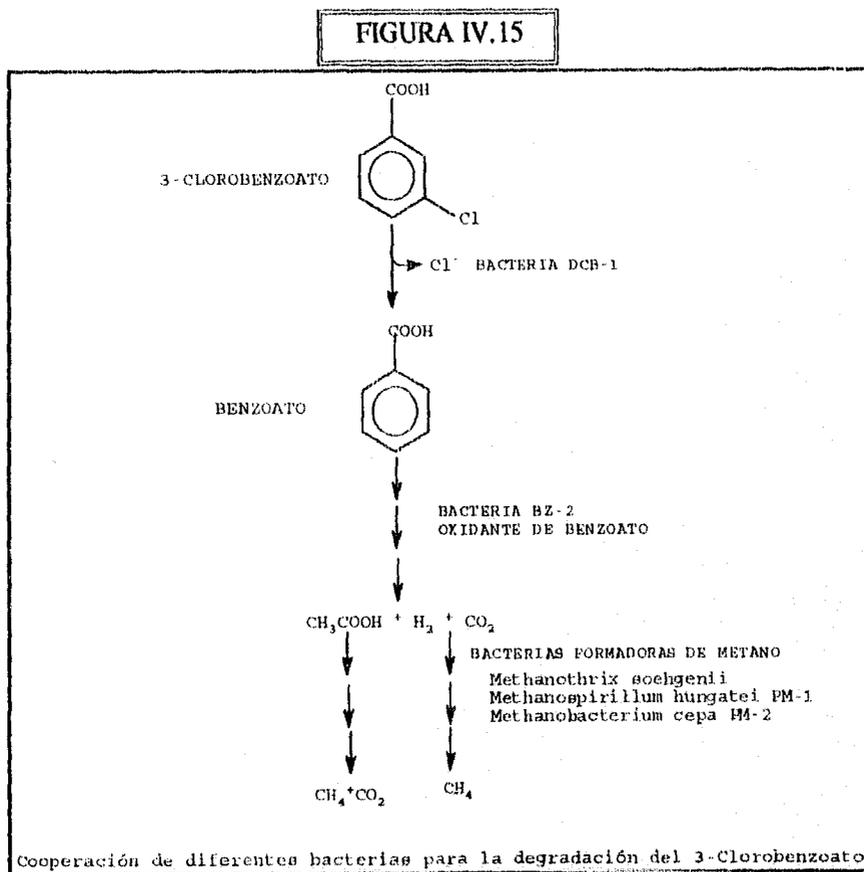


IV-4.1.2 Deshalogenación.- El punto crucial es remover el halógeno sustituyente del compuesto orgánico, lo cual puede ocurrir tempranamente en la ruta degradativa con reducción, hidrólisis o eliminación oxigenolítica. Alternativamente, se pueden generar estructuras no-aromáticas, con pérdida espontánea del haluro por hidrólisis o haluro de hidrogeno por β -eliminación [37,117].

IV-4.1.2.1 Desplazamiento del halógeno por medio de hidrógeno.- La pérdida del grupo halógeno sustituyente sucede sin la alteración del anillo aromático, el cual es recuperado en forma iónica. Cuando se han eliminado todos los átomos del halógeno, la fisión del anillo aromático conduce a la formación de metano y dióxido de carbono. Para compuestos aromáticos polisustituidos, el orden de deshalogenación es el siguiente:

orto > meta > para

Se ha reportado que la deshalogenación ocurre sólo bajo condiciones metanogénicas.



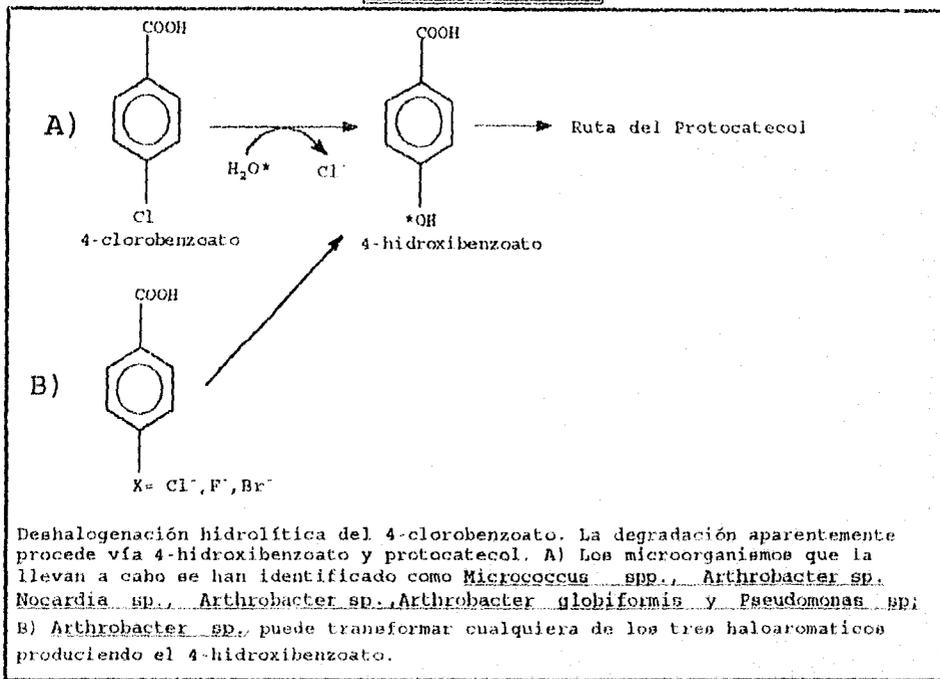
El poder reductor requerido se obtiene de los hidrógenos producidos durante la oxidación de los sustratos, por ejemplo, para la degradación del 3-clorobenzoato este poder reductor se obtiene del hidrógeno producido en la oxidación acetogénica del benzoato {Figura IV.15}.

La ventaja de la deshalogenación reductiva por microorganismos anaerobios no es utilizar al compuesto como fuente de carbono y energía sino como a un aceptor de electrones [46, 143].

IV-4.1.2.2 Desplazamiento del halógeno por el grupo hidroxilo.- Este mecanismo de deshalogenación se lleva a cabo remplazando el grupo halógeno sustituyente de la estructura aromática por medio del grupo hidroxilo y es catalizada por una enzima deshalogenasa que fue aislada de la especie *Arthrobacter sp.*

El mecanismo de deshalogenación utiliza al agua como el donador del grupo hidroxilo y no al oxígeno molecular como lo demostraron experimentos utilizando $H_2^{18}O$ y ^{18}O . La conversión enzimática del haloaromático al fenol correspondiente procede vía fisión hidrolítica del enlace carbono-cloro, por ejemplo, en la conversión del 4-clorobenzoato a 4-hidroxibenzoato se utiliza ésta vía {Figura IV.16}.

FIGURA IV.16



La misma ruta se sigue para la degradación del pentaclorofenol (PCP) por *Flavobacterium sp.*, la degradación fue iniciada por la conversión del PCP a tetracloro-p-hidroquinona por medio del desplazamiento hidrolítico del cloro. Dos descloraciones reductivas del tetracloro-p-hidroquinona, produjeron triclorohidroquinona y después 2,6-diclorohidroquinona. Sin embargo, al estudiar el metabolismo del PCP con *Rhodococcus chlorophenolicus* se obtuvo que la primera hidroxilación ocurre en la posición 4, tenga o no un grupo halógeno sustituyente en esa posición, lo cual indicaría entonces que la enzima actúa solo casualmente como una enzima deshalogenante [117].

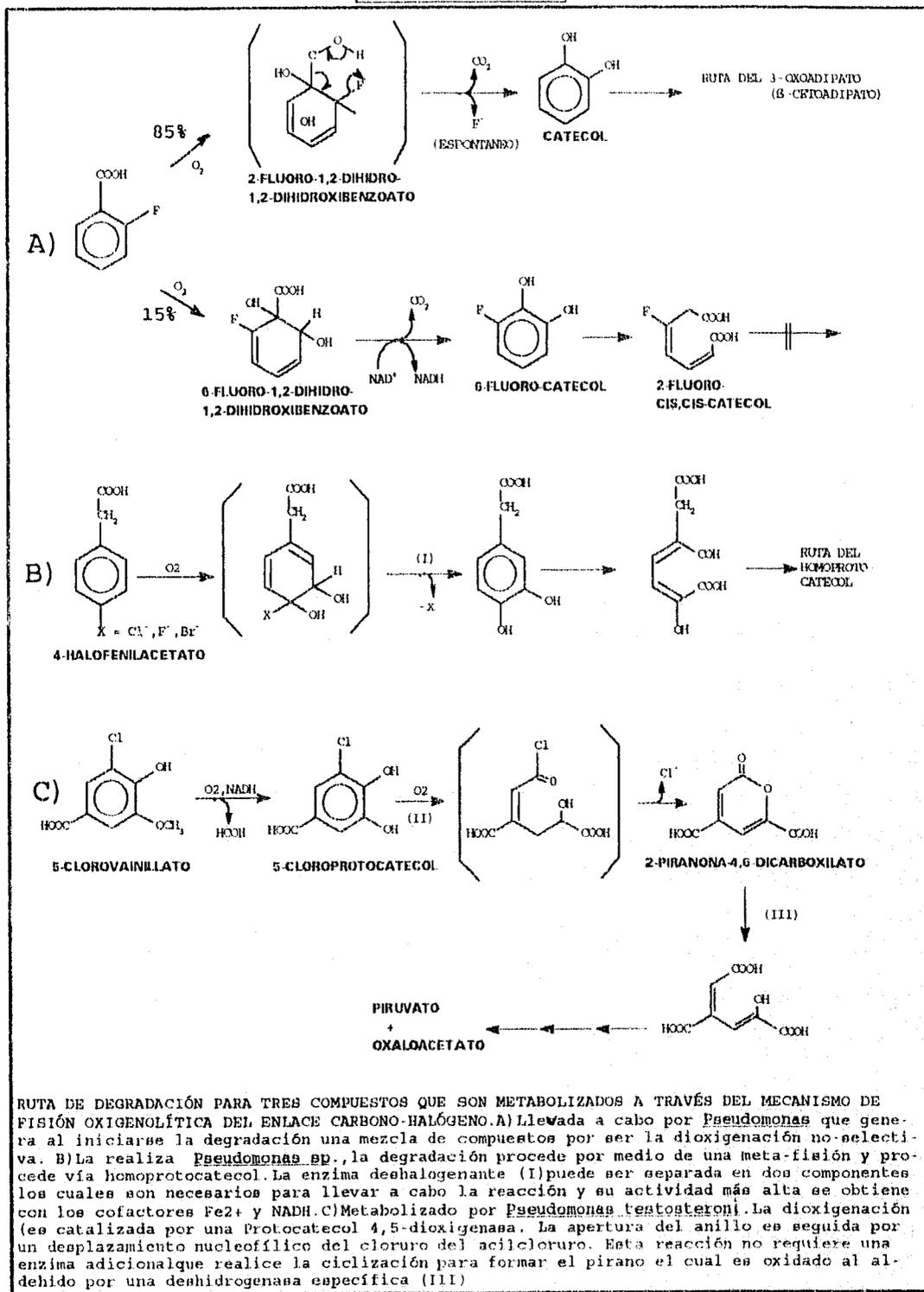
IV-4.1.2.3 Fisión oxigenolítica del enlace Halógeno-Carbono.- Este es otro mecanismo para la eliminación del halógeno sustituyente del compuesto haloaromático, en el cual sucede una fortuita deshalogenación catalizada por dioxigenasas. Se ha estudiado en el metabolismo de compuestos como el 2-fluorobenzoato, 4-clorofenilacetato el cual es además metabolizado por meta-fisión y para el 5-clorovainillato {Figura IV.17 }.

IV-4.1.2.4 Eliminación del halógeno a través de la formación de intermediarios no-aromáticos.- La forma más común de estas rutas es la eliminación del cloruro después de la orto fisión del clorocatecol. El cloruro parece ser eliminado espontáneamente después de que el enlace carbono-halógeno ha sido sensibilizado por medio de isomerasas o reductasas. La ruta de eliminación se inicia con la incorporación de oxígeno a la estructura aromática, la cual forma un intermediario no aromático obteniéndose como producto un clorocatecol {Figura IV.18}. La reacción enzimática requiere tanto de O_2 como de NADPH.

El clorocatecol sufre una orto fisión que lleva a la formación de cloro-muconatos a la que sigue una cicloisomerización en la que se pierde espontáneamente el cloruro por una eliminación *anti* {Figura IV.19}. La siguiente reacción lleva a la formación de maleil acetatos.

La cepa de *Pseudomonas* B13 cultivada en 3-clorobenceno convierte el maleil acetato a 3-oxoadipil-CoA y oxoadipato por medio de las enzimas maleil acetato reductasa y 3-oxoadipato succinil-CoA transferasa. Las enzimas aisladas de *Arthrobacter sp.* convierten el acetato maleico y el β -cloromaleil acetato a succinato con consumo de dos equivalentes de NADH o NADPH {Figura IV.19 }. El oxoadipato es un metabolito común de la ruta *orto*. [117].

FIGURA IV.17



RUTA DE DEGRADACIÓN PARA TRES COMPUESTOS QUE SON METABOLIZADOS A TRAVÉS DEL MECANISMO DE FISIÓN OXIGENOLÍTICA DEL ENLACE CARBONO-HALÓGENO. A) Llevada a cabo por *Pseudomonas* que genera al iniciarse la degradación una mezcla de compuestos por ser la dioxigenación no selectiva. B) La realiza *Pseudomonas sp.*, la degradación procede por medio de una meta-fisión y procede vía homoprotocatecol. La enzima deshalogenante (I) puede ser separada en dos componentes los cuales son necesarios para llevar a cabo la reacción y su actividad más alta se obtiene con los cofactores Fe^{2+} y NADH. C) Metabolizado por *Pseudomonas testosteroni*. La dioxigenación (es catalizada por una Protocatecol 4,5-dioxigenasa. La apertura del anillo es seguida por un desplazamiento nucleofílico del cloruro del acilcloruro. Esta reacción no requiere una enzima adicional que realice la ciclización para formar el pirano el cual es oxidado al aldehído por una deshidrogenasa específica (III).

FIGURA IV.18

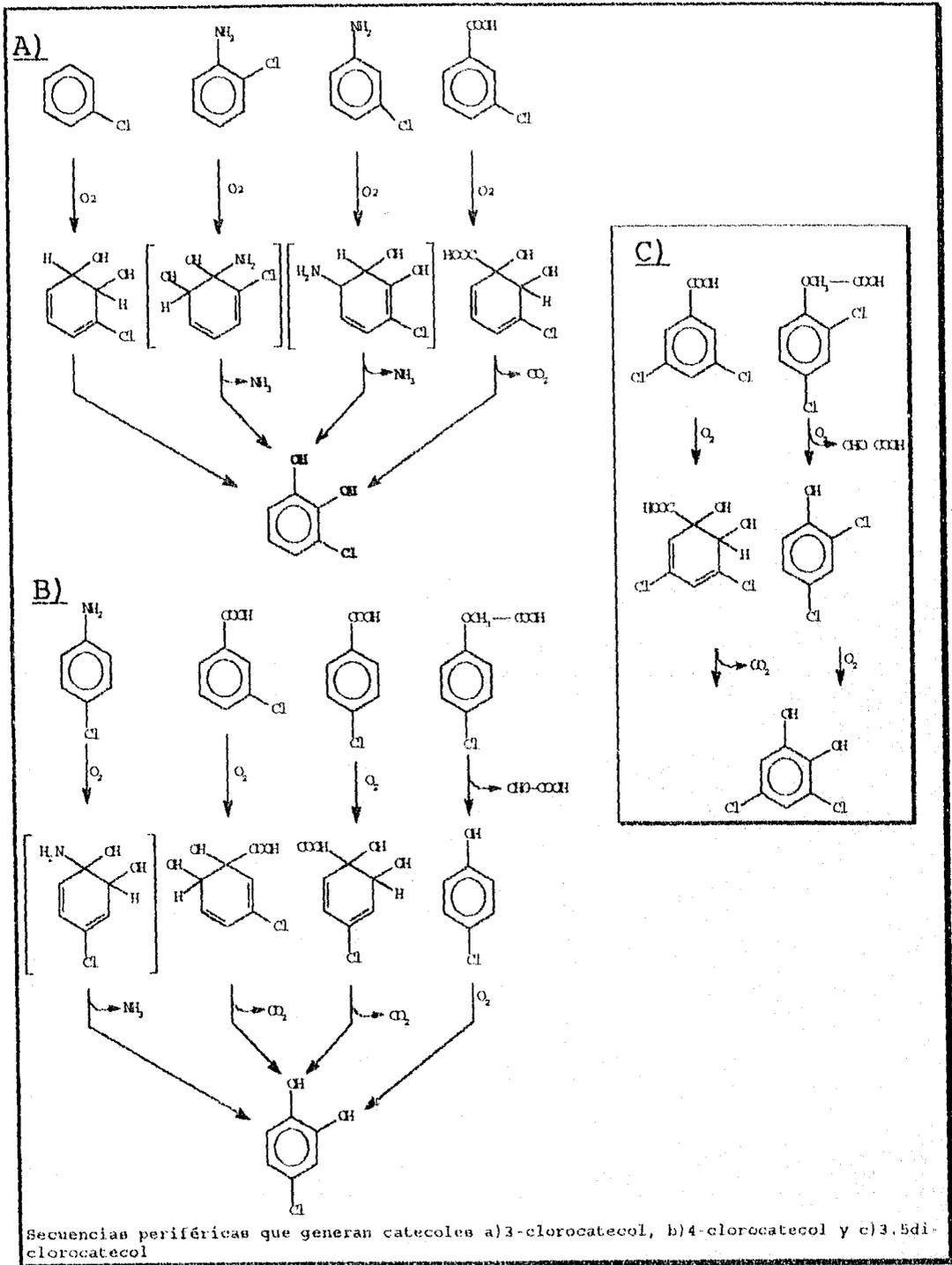
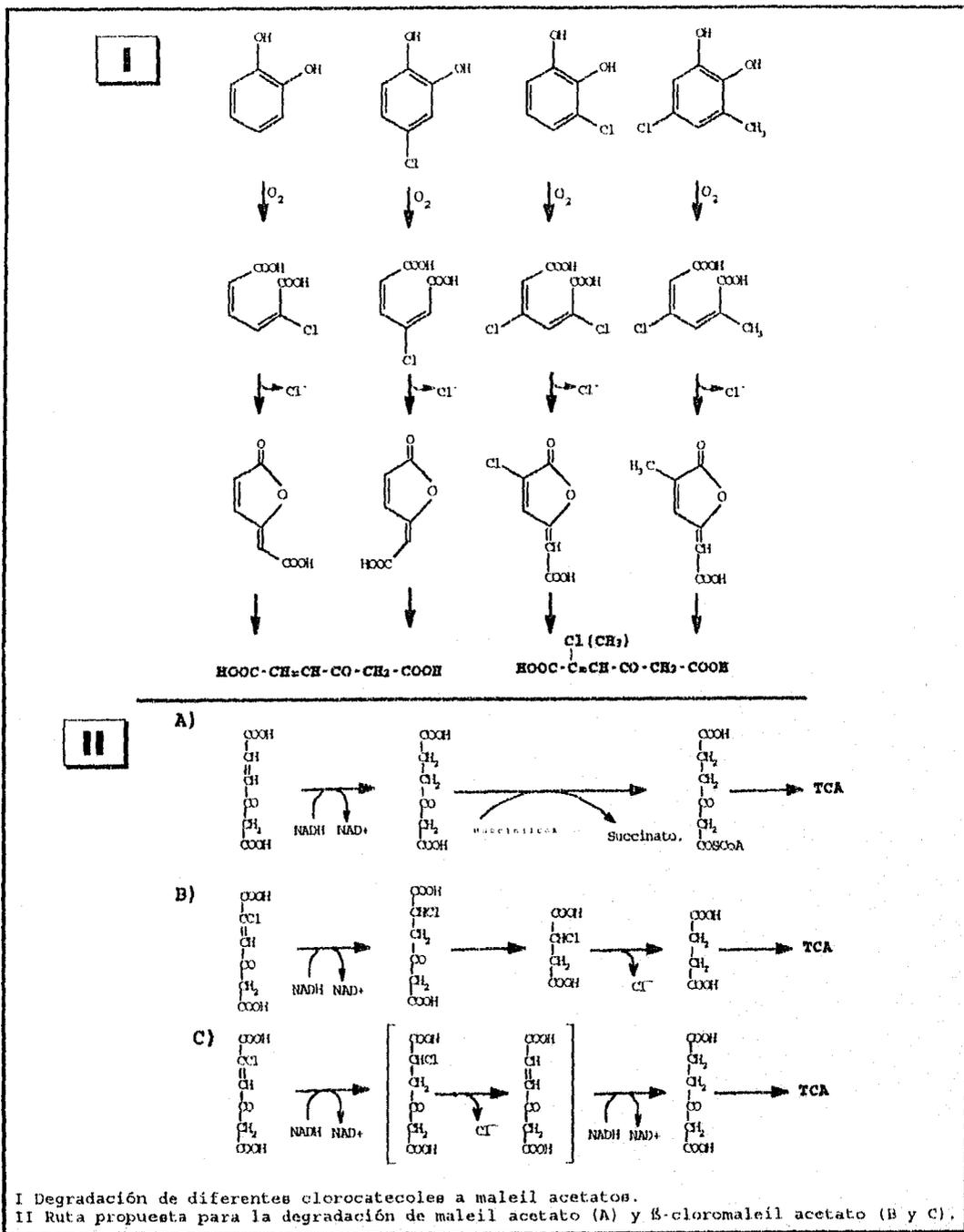


FIGURA IV.19

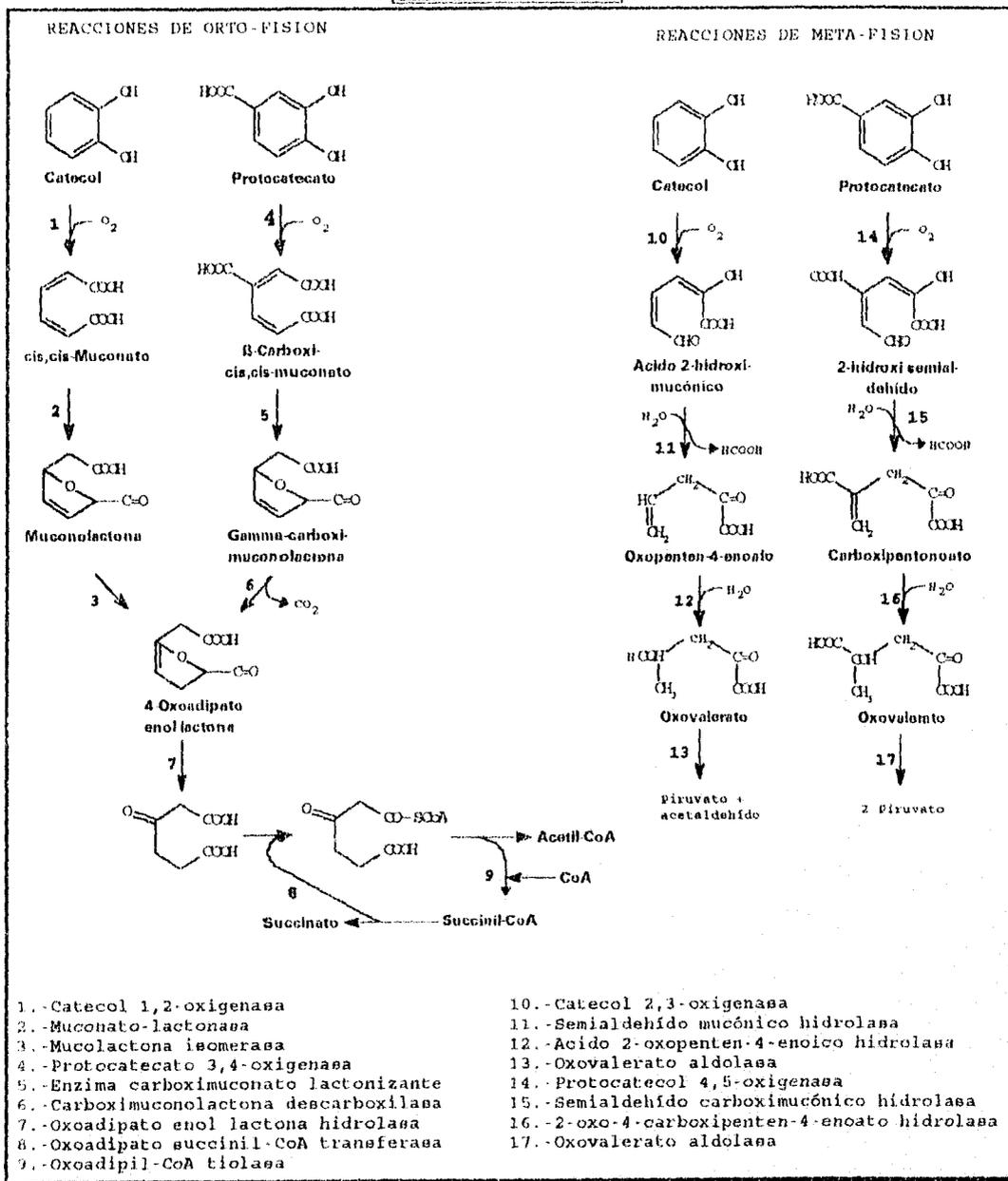


IV-4.1.3. Ruptura del anillo.- El anillo aromático del catecol y del protocatecato son escindidos vía reacciones de orto y meta fisión {Figura IV.20}. Las reacciones de orto y meta fisión son llevadas a cabo por diferentes enzimas (ver apartado IV-2, figura IV.6). Hay, por ejemplo, una catecol-1,2-oxigenasa y una protocatecato-4,5-oxigenasa.

Los productos de cada fisión, el *cis, cis*-muconato y el 3-carboxi-*cis, cis*-muconato, producen en dos reacciones subsecuentes el primer intermediario común, el 4-oxoadipato enol lactona. Este compuesto se degrada para producir succinato y acetil-CoA. La canalización de diversos compuestos dentro de unas pocas rutas centrales beneficia al microorganismo al simplificar los circuitos reguladores, control genético, y reducir los requerimientos energéticos.

La ruta de meta-fisión utiliza la enzima catecol-3,4-dioxigenasa para abrir el anillo adyacente al grupo hidroxilo. El metabolismo conduce a la formación de piruvato, formato, y acetaldehído [37].

FIGURA IV.20



IV-4.2 DEGRADACION MICROBIANA DE COMPUESTOS PARTICULARES

IV-4.2.1 Cloroanilinas.- Las cloroanilinas están ampliamente distribuídas en el medio ambiente. Son usadas en la síntesis de plaguicidas, tintes, plásticos y productos farmacéuticos.

En adición a lo anterior, las cloroanilinas se extienden en el medio ambiente cuando son metabolizadas por microorganismos a partir de compuestos cloronitroaromáticos o plaguicidas como los clorofenilcarbamatos, clorofenilureas y acilcloroanilinas. Como metabolitos de los plaguicidas, están presentes en el suelo en relativa baja concentración. Debido a la adsorción físico-química a matrices húmicas en el suelo, las cloroanilinas persisten y permanecen detectables por años después del tratamiento del suelo con el herbicida. Esto puede afectar negativamente la microflora del suelo, por ejemplo, inhiben a las nitrosomonas.

De algunas cepas microbianas tales como *Pseudomonas acidovorans* CA28, *Pseudomonas sp* JL2, se conoce su capacidad para degradar cloroanilinas utilizándolas como única fuente de carbono y de energía, mientras que otras cepas como *Rhodococcus* AM114 sólo las transforman parcialmente.

Algunos microorganismos degradadores de lignina pueden metabolizar discretamente cloroanilinas y conjugados de lignina con cloroanilinas. La transformación de cloroanilinas por hongos de la podredumbre blanca puede llevar a altas concentraciones tóxicas de tetracloroazobencenos [21].

IV-4.2.2 Clorocatecol.- Los clorocatecoles son generalmente degradados por la ruta de orto fisión (ver figura IV.6). El metabolismo a través de meta fisión puede dar como resultado intermedios tóxicos o intermediarios de punto muerto (callejón sin salida). Las dioxigenasas normales tienen baja afinidad hacia los compuestos clorados, sin embargo, se han encontrado dioxigenasas y cicloisomerasas que presentan afinidad para sustratos cloroaromáticos. En *Pseudomonas sp* cepa B13, se encontró que el metabolismo de catecoles y clorocatecoles es realizado por dos vías de orto-fisión diferentes; esto da la idea de que existen dos enzimas isofuncionales, la Pirocatecasa I está presente en células que crecen en benzoato y es altamente específica para catecol. La Pirocatecasa II fue inducida cuando el sustrato de crecimiento fue el 3-clorobenzoato; esta enzima presenta una alta actividad hacia los bencenos clorosustituidos.

También se encontraron otros dos tipos de enzimas isofuncionales para la cicloisomerización del cis-cis-muconato y cis,cis-cloromuconato. La cicloisomerasa I fue altamente específica para el cis,cis-muconato mientras que la cicloisomerasa II tuvo alta

IV-4.2.3 Clorobenzoatos.- La ruta propuesta para la degradación del 3-clorobenzoato (3-CBA) por *Pseudomonas sp.* cepa B13 {Figura IV.22} y las enzimas involucradas en dicha degradación oxidativa se han identificado. Un esquema similar de degradación del 3CBA se ha encontrado en la especie *Acinetobacter calcoaceticus*. Otra especie que también es capaz de degradar al 3CBA es la especie *P. putida*.

El plásmido pAC25 y una porción del plásmido TOL capacitan a las células hospederas para utilizar tanto al 3CBA como al 3,5-diclorobenzoato (3,5-DCBA). La ruta metabólica de degradación de estos dos compuestos por la cepa reconstruída se presenta en la figura IV.23, al igual que la ruta de degradación de otros clorobenzoatos, tales como el 4CBA y el 2,4-DCBA, por *Corynebacterium sepedonicum*.

Los clorobenzoatos, también pueden ser biodegradados bajo condiciones reductivas. Sin embargo, la información concerniente a los microorganismos capaces de degradar los clorobenzoatos por reducción aún no es suficientemente clara [32].

IV-4.2.4 4-Clorofenilacetato.- *Pseudomonas sp.* cepa CBS3 es hábil para utilizar 2-cloroacetato, 4CBA, y 4-clorofenilacetato. En la degradación del 4-clorofenilacetato, el 3,4-dihidroxifenilacetato es el principal compuesto intermediario que se metaboliza vía meta-fisión. Esta ruta difiere de la degradación del 2,4 diclorofenoxiacetato (2,4-D, ver más abajo) en que primero se pierde el grupo acetato y cambia a 2,4-diclorofenol. En la ruta metabólica del 4-clorofenilacetato se realiza la eliminación del halógeno antes de que el anillo sufra fisión. Ver figura IV.24 [32].

FIGURA IV.22

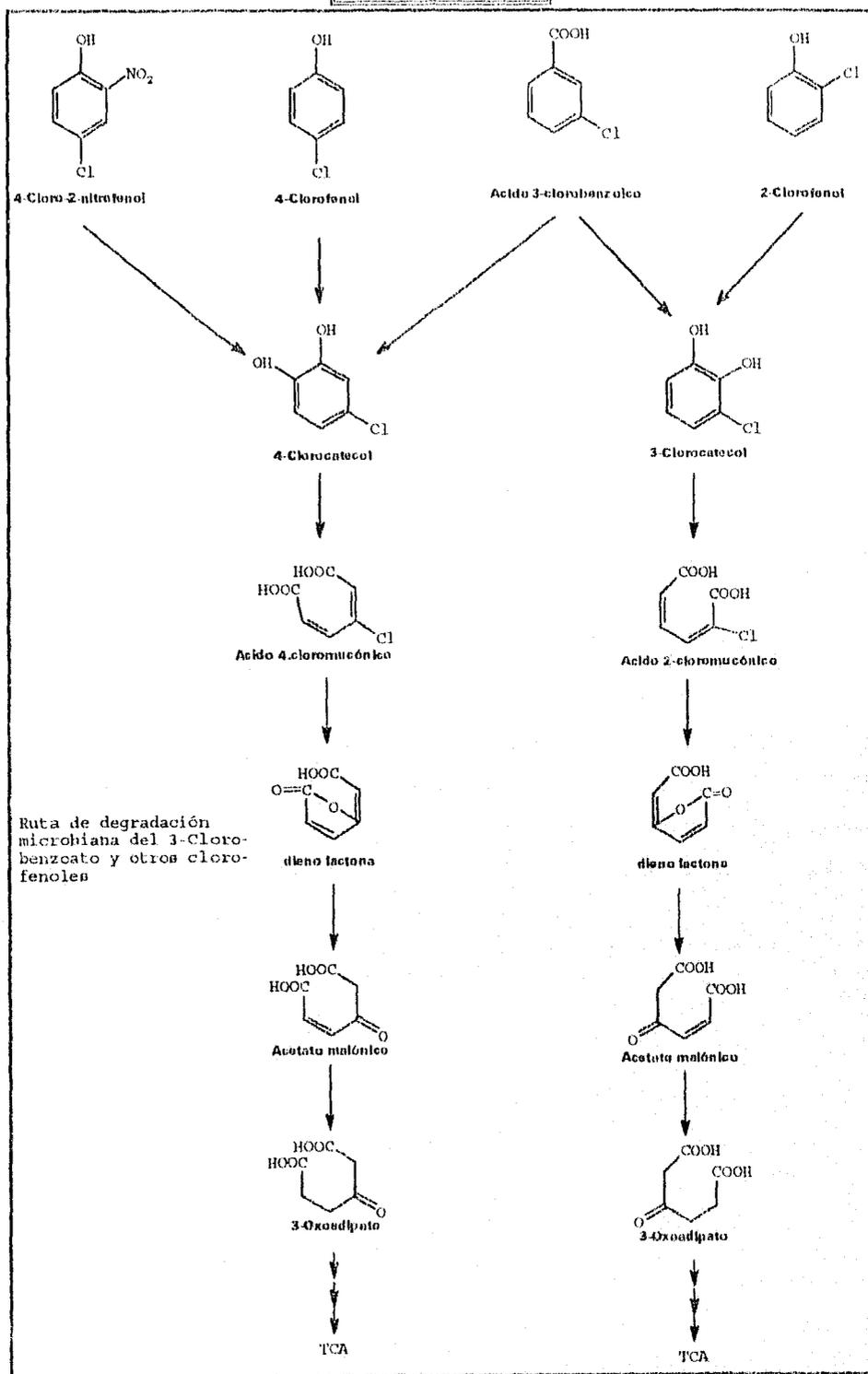
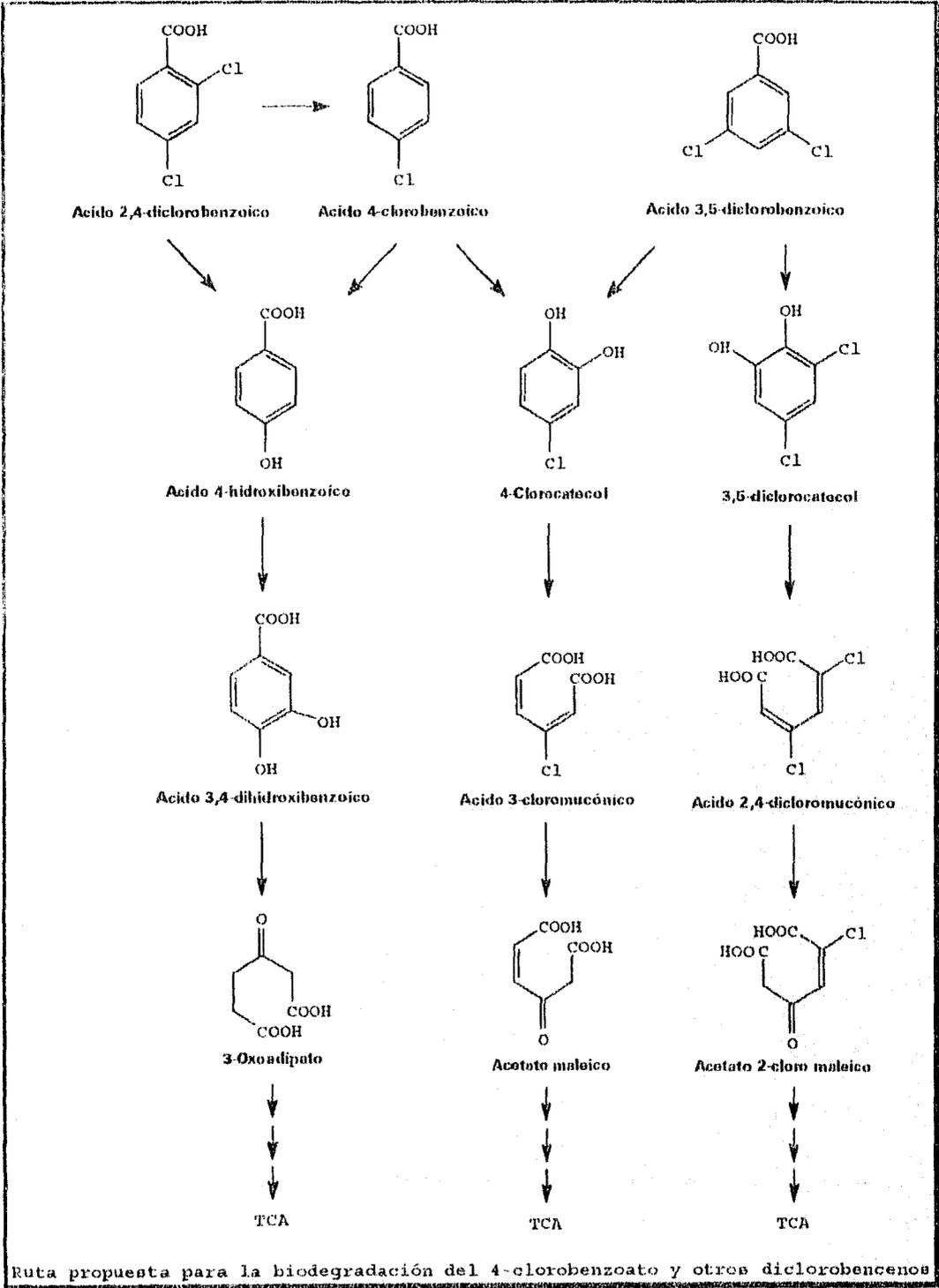
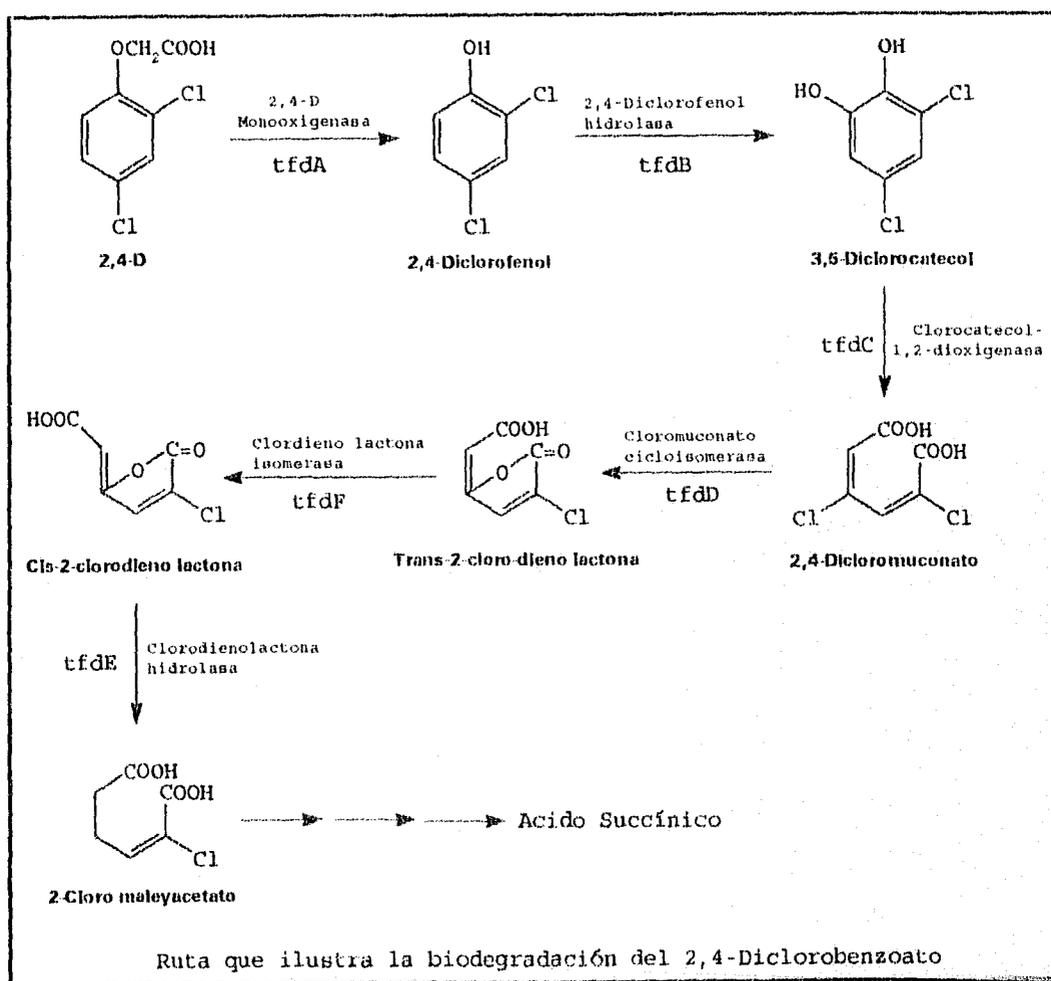


FIGURA IV.23



IV-4.2.5 Clorofenoxiacetatos.- Los derivados de los fenoxiacetatos, tales como el 2,4 diclorofenoxiacetato (2,4-D) y el 2,4,5 triclorofenoxiacetato (2,4,5-T), han sido liberados al medio ambiente como herbicidas por 40 años. Muchos compuestos sintéticos recalcitrantes como el 2,4-D, son rápidamente degradados por microorganismos del suelo como es el caso de la cepa *Alcaligenes eutrophus* {Figura IV.24}. En esta cepa, los genes que codifican para la degradación del 2,4-D son plásmidos siendo el plásmido pJP4 de *A. eutrophus* JNP134 uno de los más extensamente estudiados [37,32].

FIGURA IV.24



Una ruta alternativa de degradación del 2,4-D propone la formación de ácido clorosuccínico como producto final de degradación (Referencia Fisher et al 1978). Las bacterias del suelo que degradan al 2,4-D tienen la capacidad de romper el enlace éter para producir 2,4-diclorofenol [37]

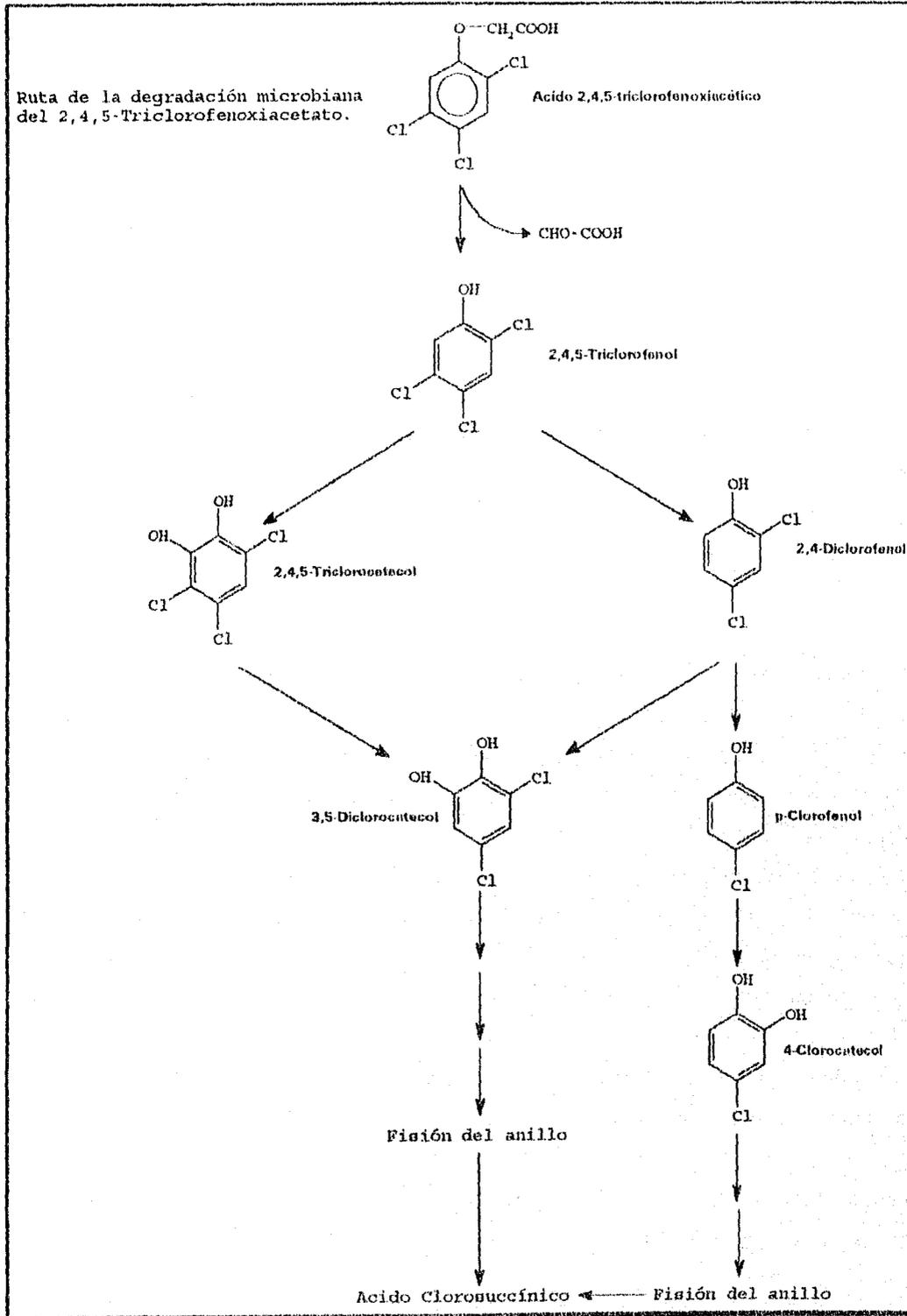
La ruta de degradación del herbicida 2,4,5-T comienza con la conversión a triclofenol y clorocatecol antes de ocurrir la fisión del anillo {Figura IV.25}. Se tiene mucha información sobre los genes que codifican para la degradación de estos compuestos [32].

IV-4.2.6 Clorotolueno.- La especie de *P. cepacia* y otras especies diferentes de *Pseudomonas* tienen la capacidad para utilizar mono y diclorotoluenos como la única fuente de carbono y de energía. Estas cepas contienen plásmidos los cuales codifican para la degradación de toluenos. La ruta de degradación no ha sido reportada [32].

IV-24.2.7 Dicamba.- El dicamba es usado como un herbicida pre y postemergente para el control de las malas hierbas de hojas anchas caducas y perennes y de otros tipos de follajes. El dicamba es similar en acción herbicida a los ácidos fenoxi alcanóicos, tales como el 2,4-D, pero pertenece a la clase conocida como benzoicos. El modo específico de acción del dicamba es desconocido. La sintomatología producida (anormalidades en la floración, y formación de tallos y hojas) indica que el dicamba actúa para limitar el transporte de auxinas en las plantas. Las especies de plantas resistentes absorben, translocan, y metabolizan al dicamba, mientras que las especies susceptibles no pueden hacerlo con facilidad. El dicamba es sintetizado en una serie de reacciones que inicia con el 1,2,4-triclorobenceno.

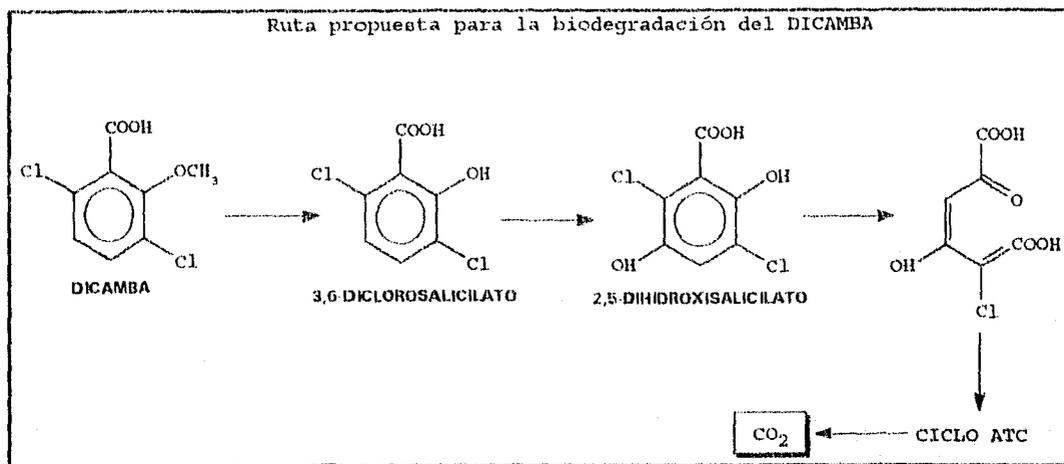
El dicamba es químicamente estable y hay evidencia que sugiere que su degradación en suelos anaerobios y agua es mediada biológicamente. Los estudios del metabolismo en suelos anaerobios han demostrado que el dicamba es metabolizado a CO₂ y que el 3,6-diclorosalicilato es el metabolito intermediario principal. Sin embargo, no han sido identificados los factores biológicos involucrados en el metabolismo del dicamba.

FIGURA IV.25



El dicamba afecta el crecimiento de ciertos cultivos comerciales, principalmente al frijol de soya. Usando ^{14}C marcado en el dicamba, se ha demostrado la habilidad de especies de *Pseudomonas* para completar la mineralización del dicamba a $^{14}\text{CO}_2$. A través de la técnica de cromatografía en capa fina y HPLC, se propuso una ruta de degradación del dicamba {Figura IV.26}.

FIGURA IV.26

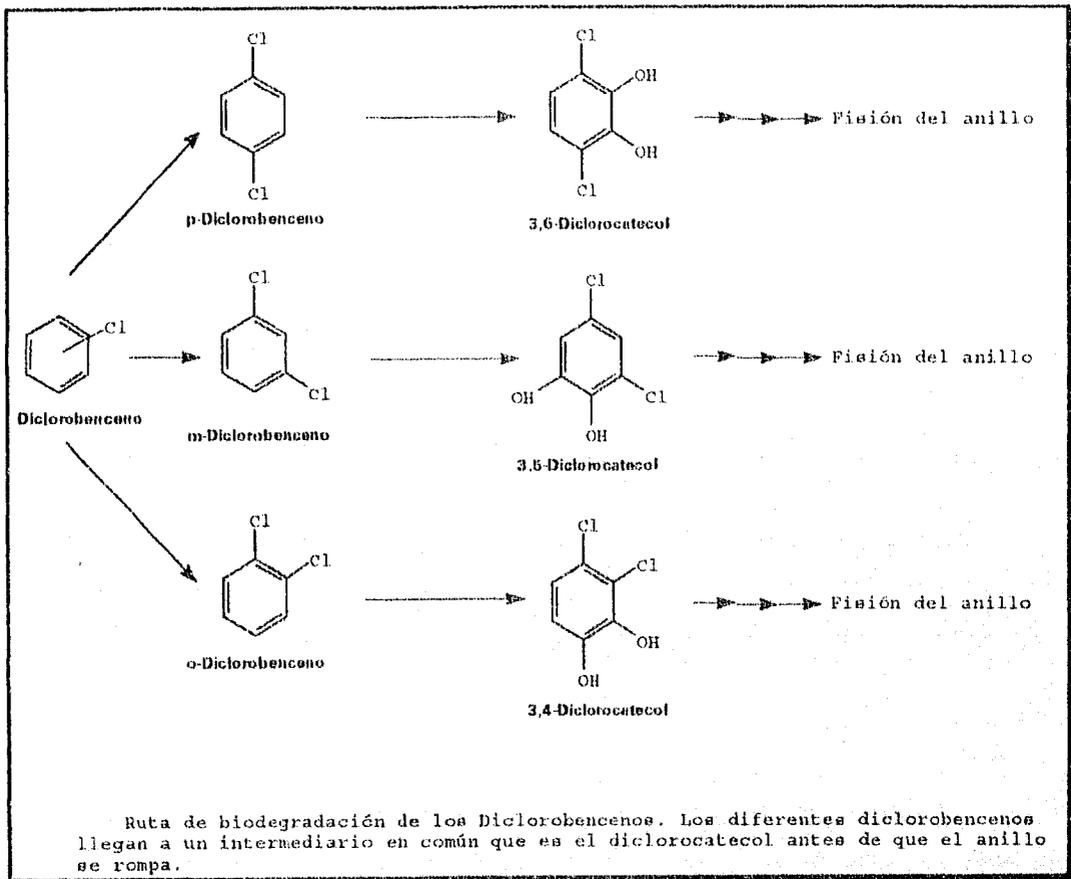


Las bacterias capaces de utilizar al dicamba como única fuente de carbono fueron obtenidas por enriquecimiento de suelos y agua con una larga historia de exposición al dicamba y se identificaron como *Pseudomonas sp.* cepa DI-6 y DI-8, *Moraxella sp.* cepa DI-7 [37].

IV-4.2.8 Diclorobenceno (DCB).- Hay poca información sobre el papel de los microorganismos en la eliminación de los compuestos aromáticos halogenados. Recientemente, bacterias como *Alcaligenes spp.* y *Pseudomonas spp.* que utilizan clorobenceno, 1,2-diclorobenceno (o-DCB), 1,3-diclorobenceno (m-DCB) y 1,4-diclorobenceno (p-DCB) como única fuente de carbono se han aislado o han sido construídos a partir de ingeniería genética. Sin embargo, las bases genéticas de la degradación de clorobencenos en estos microorganismos no han sido descritas.

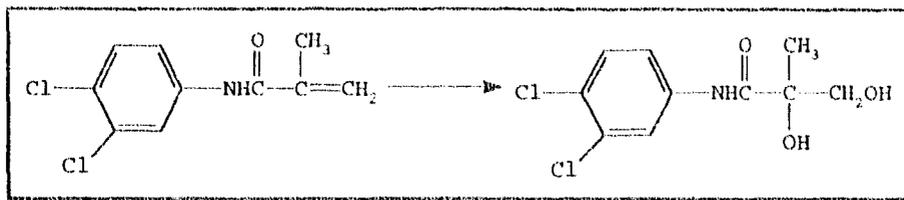
La deshalogenación de los clorobencenos se hace bajo condiciones anaerobias. La ruta metabólica para la degradación de o-, m-, p-diclorobenceno {Figura IV.27} sugiere que todos ellos forman un intermediario común, el diclorocatecol, para después romper el anillo de benceno [32].

FIGURA IV.27



IV-4.2.9 Dicryl.- La conversión del dicryl es realizada por el hongo *Rhizopus japonicus* y llega a un máximo de conversión cuando el crecimiento fúngico es finalizado. En una semana, el 22% del dicryl es transformado a sus metabolitos {Figura IV.28}, pero el 78% permanece sin cambios [2].

FIGURA.IV.28



IV-4.2.10 Pentaclorofenol (PCP).- El pentaclorofenol (PCP) es un contaminante muy esparcido en suelos, y mantos freáticos. Es un conservador importante de maderas, además de ser herbicida, fungicida y biocida en general [32,22,].

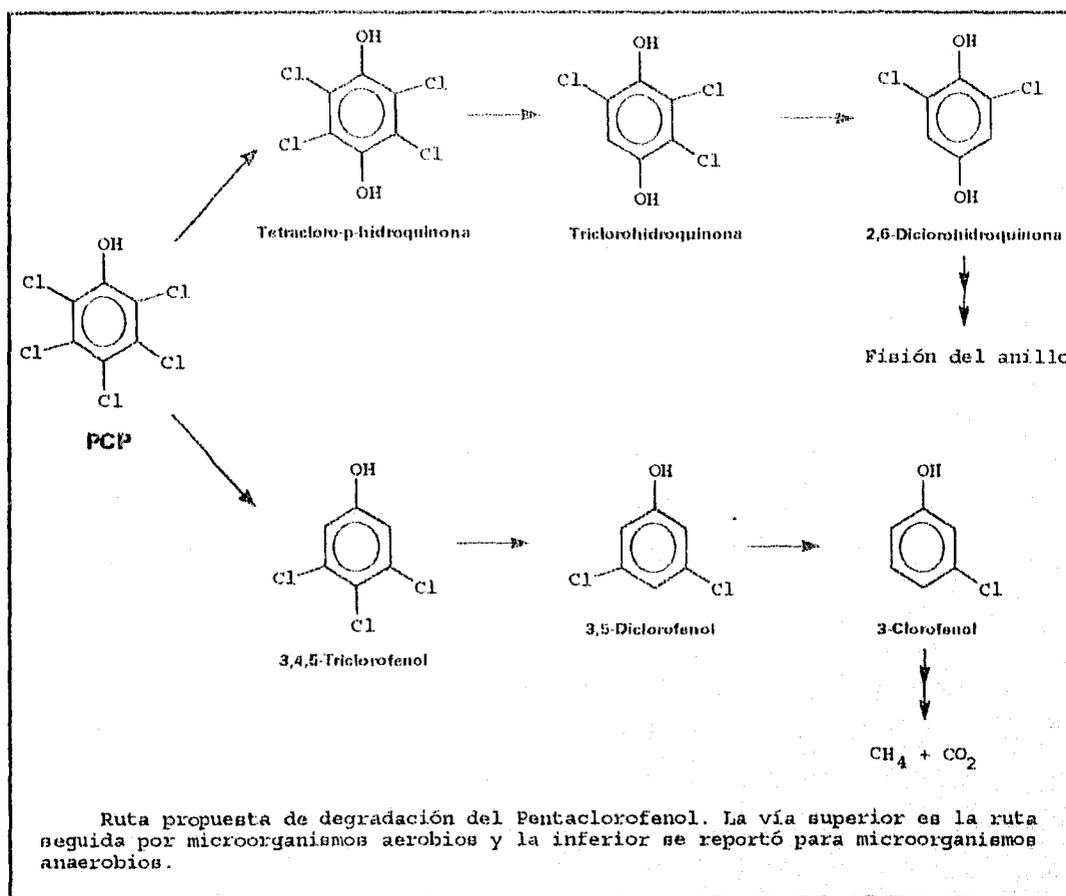
En 1983, la producción mundial de de PCP fue estimada en 5×10^7 Kg. La toxicidad de los fenoles clorados tiende a incrementarse con su grado de cloración y por el hecho de que pocos microorganismos pueden degradarlo. Las bacterias que se han aislado de zonas contaminadas con PCP se identificaron como *Arthrobacter sp.*, *Pseudomonas cepacia* y *Flavobacterium sp* [32,117].

El metabolismo del PCP bajo condiciones aerobias se inicia con el desplazamiento de la posición *para* del cloruro por un grupo hidroxilo (deshalogenación reductiva), produciendo 2,3,5,6-tetraclorohidroxiquinona reacción que es catalizada por la PCP hidrolasa. El metabolismo continua con la formación de tricloroquinona y dicloroquinona, seguida de la completa mineralización del PCP [32,62,151].

Bajo condiciones anaerobias, el PCP es degradado a triclorofenol por una rápida eliminación de los grupos cloro de las posiciones 2 y 6; entonces se presenta una eliminación del cloro en posición *para* dando lugar a la formación de diclorofenol y finalmente se lleva a la formación de monoclorofenol. El anillo bencénico se rompe para producir metano y CO_2 . Las rutas de degradación aerobias y anaerobias del PCP se presentan en la figura IV.29 [117, 32].

Se han hecho Intentos de utilizar células inmovilizadas en poliuretano para degradar PCP. Las células inmovilizadas pertenecen a la especie de *Flavobacterium sp.* pero aún faltan más estudios a este respecto para desarrollar métodos viables de biorremediación [107].

FIGURA.IV.29



Los estudios recientes han indicado que la degradación microbiana del PCP conduce a la formación de metabolitos intermedios los cuales son más tóxicos que el compuesto original. Para comprobar la toxicidad relativa del PCP y de algunos de sus metabolitos identificados, como productos de la actividad microbiana, se ha hecho uso de un cultivo estático de *Tetrahimena pyriformis* encontrándose, que cuando los intermedios están deshalogenados su toxicidad se ve disminuida a causa de una disminución en la hidrofobicidad y en su reactividad, pero cuando estos productos fueron metilados, la toxicidad se incrementa debida al aumento en la reactividad [22].

IV-5 BIODEGRADACION DE COMPUESTOS NITROAROMATICOS

Compuestos tales como los nitrobenenos, nitrotoluenos, nitrofenoles y nitrobenzoatos son usados en la manufactura de plaguicidas (Parathión, Paraoxón y Treflan), tintes, explosivos, espuma de poliuretano, elastómeros y solventes industriales.

Otros compuestos nitrados aromáticos que se encuentran como contaminantes son el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) que ha sido usado extensivamente en la elaboración de explosivos. Los nitrobifenilos son importantes como plastificantes del acetato de celulosa y el poliestireno, como fungicidas textiles y preservadores de madera, y en la síntesis de tintes. Antibióticos como el cloranfenicol y el tranquilizante nitrazepam son ejemplos de fármacos en los cuales su acción depende de la presencia del grupo nitro en el anillo aromático; las nitroanilinas y sus derivados aparecen en aguas de desecho de la elaboración de tintes y de la industria farmacéutica y en el suelo como metabolitos de la degradación microbiana de ciertos herbicidas [64].

Los mantos freáticos, suelos y sedimentos de muchos sitios militares están contaminados con desechos nitroaromáticos como resultado de la manufactura, ensamblaje y empaque de armas y productos que contienen explosivos [15].

Los compuestos aromáticos que presentan sólo un grupo nitro sustituyente son los más rápidamente degradados por los microorganismos del suelo; pero el Trinitrotolueno (TNT), que es un compuesto en el que hay impedimento estérico y está electrónicamente desactivado es mucho menos susceptible a la oxidación microbiana y en caso de llevarse a cabo esta oxidación, conduce a la formación de compuestos más tóxicos que la estructura original [64].

IV-5.1 METABOLISMO MICROBIANO DEL GRUPO NITRO

El grupo nitro sustituyente puede ser reducido o eliminado de la estructura aromática.

La reducción del grupo nitro puede hacerse en condiciones aerobias y anaerobias {Figura IV.30}. En condiciones anaerobias se estudió a partir de una preparación enzimática de la especie *Veillonella alkalescens* que catalizó la reducción del grupo nitro por hidrogenación vía R-NO y R-NHOH. Para el caso de la reducción aerobia, ésta se estudió recientemente en la especie *Citrobacter fecundii* de donde se aisló una reductasa que degradó TNT aeróbicamente. Un basidiomiceto del género *Rhodospiridium* puede transformar por una ruta reductiva al 4-cloronitrobenceno para producir una amina: la 4-cloroanilina {Figura IV.31}. La nitrorreducción es presumiblemente llevada a cabo por enzimas del metabolismo normal del microorganismo.

En el caso de que el grupo nitro sea eliminado de la estructura aromática, se hace a través de nitroreductasas para generar una amina y después amonio, ó puede formarse el ión nitrito que es liberado en la reacción reductiva; por ejemplo, la especie *Pseudomonas putida* (aislada por Zeyer y Kearney en 1982) utiliza 2-nitrofenol para formar catecol y nitrito y cuando utiliza 3-nitrofenol libera amonio [64].

IV-5.2 DEGRADACION MICROBIANA DE COMPUESTOS PARTICULARES.

IV-5.2.1 Cloronitrofenol.- El metabolismo del 4-cloro-2-nitrofenol se reportó para *Pseudomonas sp* cepa N31 la cual expresa una enzima que es la nitrofenol oxigenasa. En la transconjugación el clorocatecol acumulado se consume, lo cual indica que actuó como fuente de carbono. Como producto final de la mineralización se identificó nitrito [64].

FIGURA IV.30

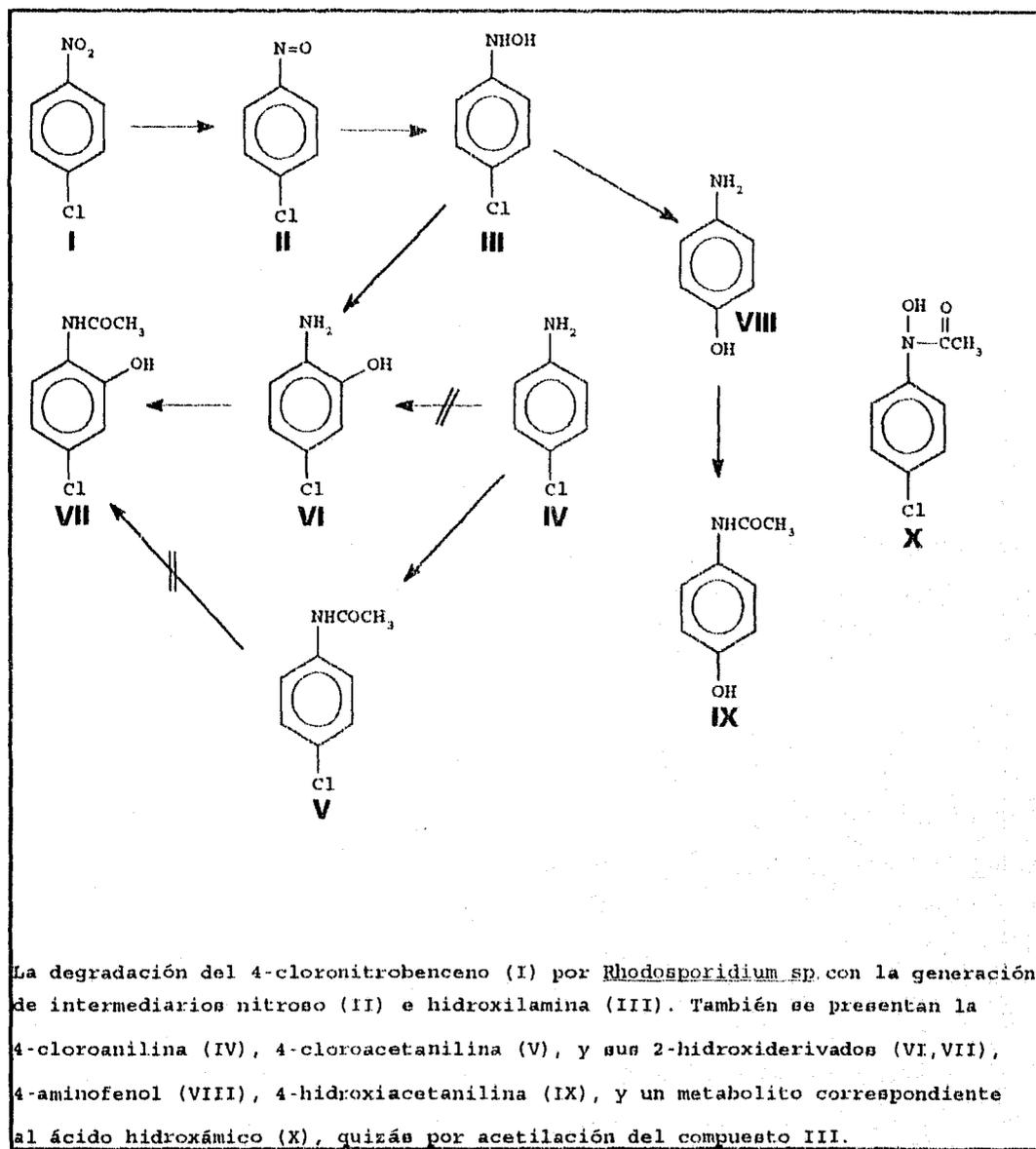
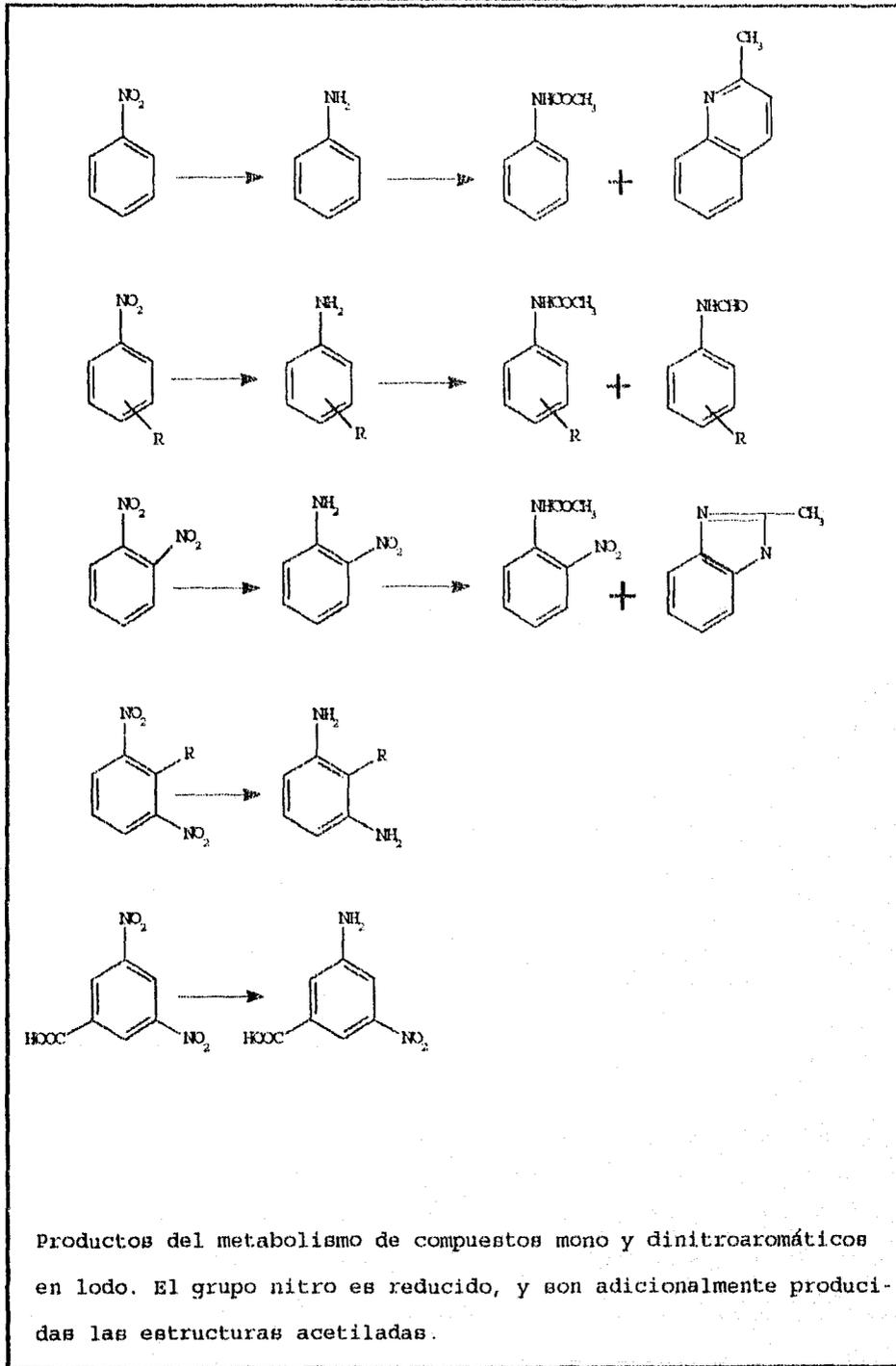


FIGURA IV.31



IV-5.2.2 Nitrobenzeno.- Llevada a cabo por *Nocardia*. Los metabolitos así como la ruta de degradación no se reportaron pero se sabe que hay una completa mineralización del nitrobenzeno [64].

IV-5.2.3 Nitrofenol.- Se ha reportado el metabolismo de diferentes nitrofenoles entre los que están:

- a) 4-nitrofenol
- b) 3,5-dinitro-2-metilfenol (herbicida)
- c) 2-nitrofenol
- d) 3-nitrofenol.

Los productos finales del metabolismo de los anteriores compuestos se han identificado como nitritos, catecol, CO₂ e hidroquinona. Las cepas bacterianas responsables de la mineralización que han reportado son *Pseudomonas sp*, *Arthrobacter* y *Moraxella sp*.

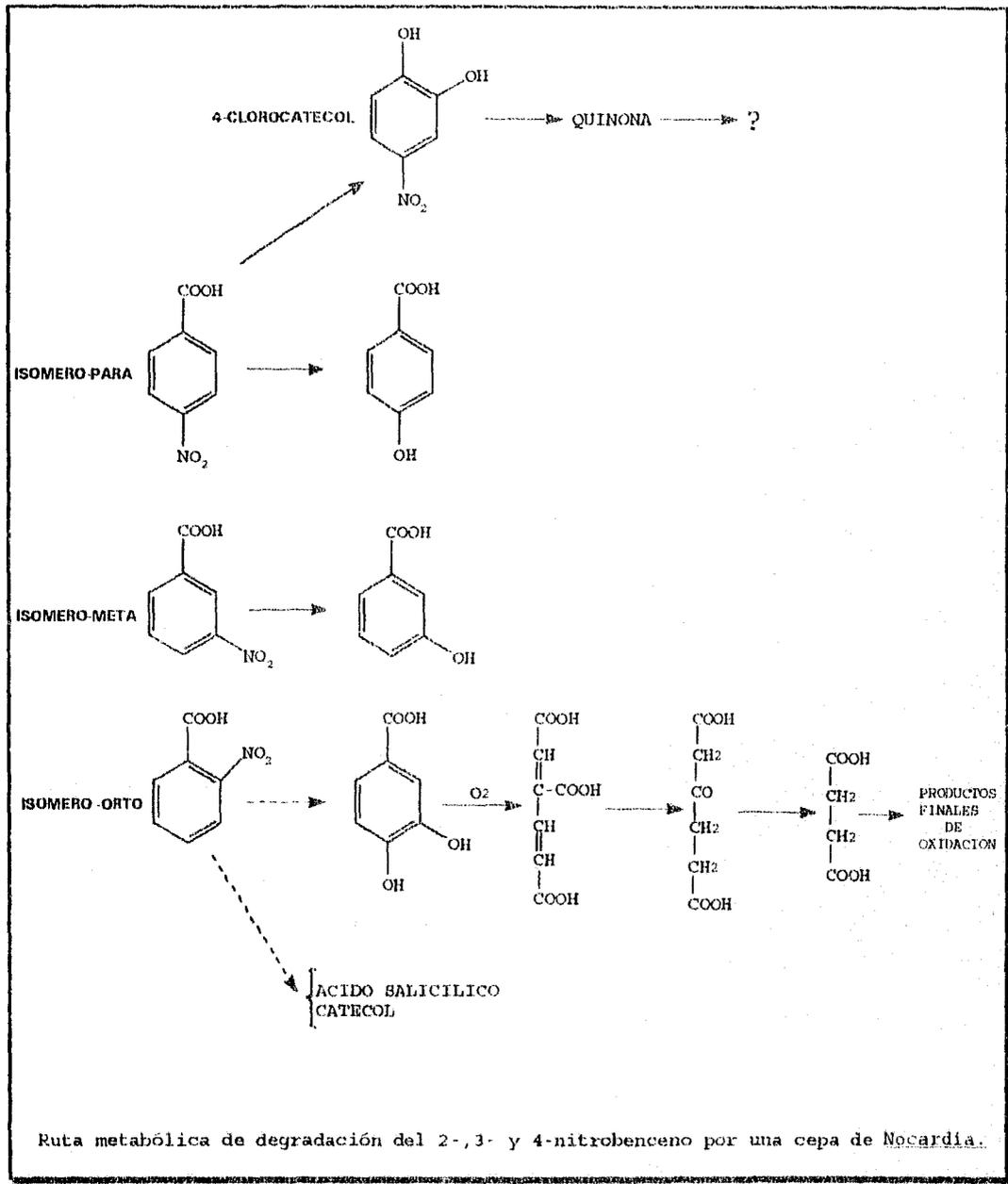
La actividad enzimática es dependiente de NAD(P)H y oxígeno y es estimulada por FAD. Usando ¹⁸O se demostró que el ingreso del grupo hidroxilo proviene del oxígeno molecular [64].

IV-5.2.4 Nitroanilinas.- *Pseudomonas P6* se ha reportado que degrada 4-nitroanilina resultando catecol como producto final. La degradación de este compuesto se acrecentó al adicionar extracto de levadura. La identificación de los metabolitos no pudieron realizarse por HPLC, pero por analogía de la degradación de anilina y 3-cloroanilina por *P. multivorans* se estableció la ruta del nitrocatecol [64].

IV-5.2.5 Nitrobenzoatos.- En el metabolismo del 4-nitrobenzoato, hay acumulación del 4-hidroxibenzoato bajo condiciones de estricta aeración {Figura IV.32}. El producto final es 3-

hidroxibenzoato nitrocatecol y es llevada a cabo por especies de *Nocardia* y *Flavobacterium* [64].

FIGURA IV.32



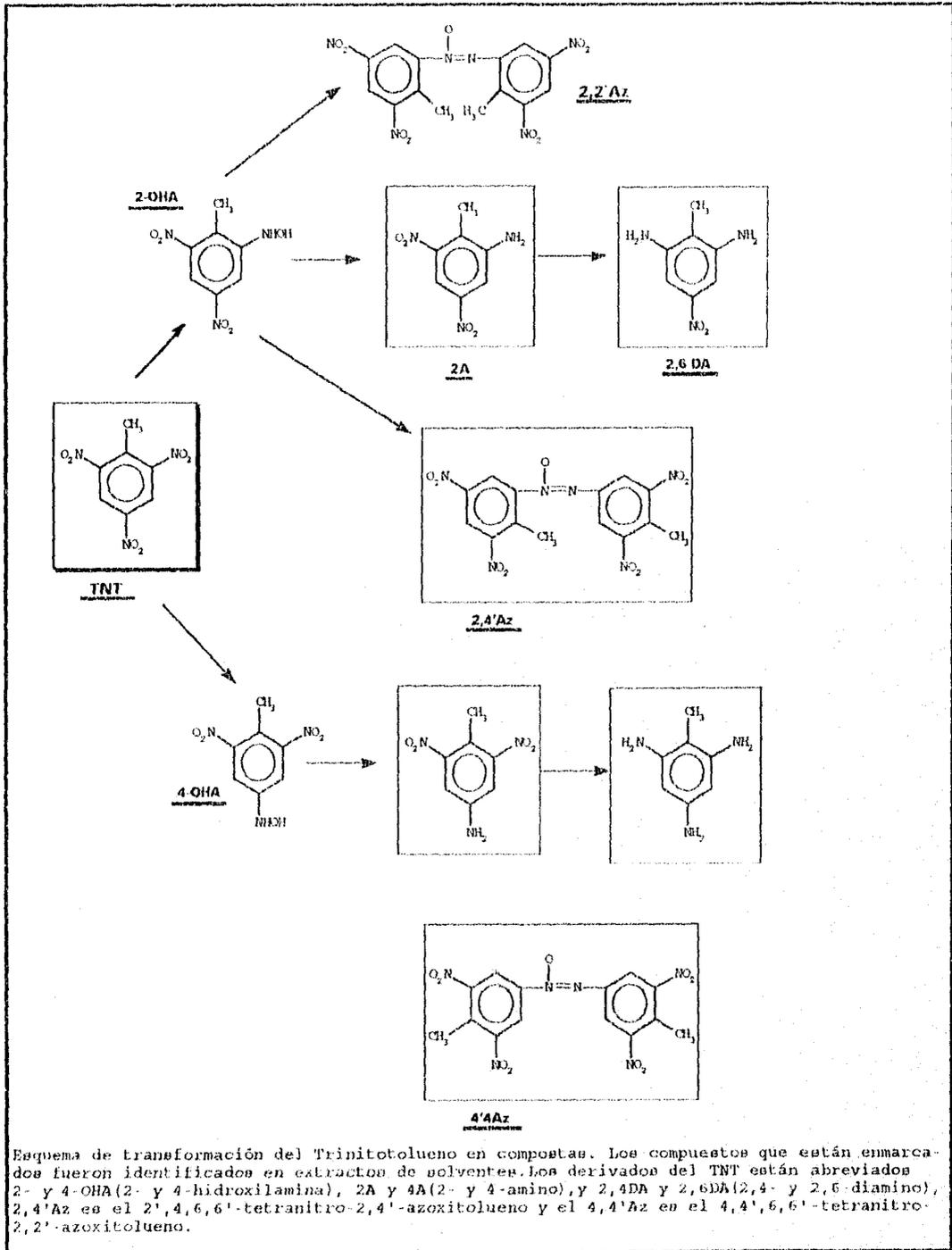
IV-5.2.6 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT).- En cuanto al 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) se ha informado su mineralización por cepas de *Pseudomonas* y *Phanerochaete chrysosporium* obteniéndose como productos finales CO₂ y nitrito [64,15].

El TNT es tóxico para algas unicelulares de agua dulce (*Salenastrum capricornutum*, *Microcystis aeruginosa*, *Chlamydomonas reinhardtii*) y larvas de ostra a una concentración por abajo de 2.5 ppm.

En seres humanos provoca la muerte por hepatitis tóxica y anemia aplásica causadas por exposición al TNT que afecta la sobrevivencia de eritrocitos y la función hepática. También provoca metahemoglobinemia, cianosis, anemia e ictericia como resultado de la exposición a dinitrotolueno (DNT) en los lugares de trabajo. A una dosis mayor, causa carcinoma hepatocelular en ratas alimentadas con DNT [63].

En estudios posteriores realizados por Kaplan y Kaplan en 1982 [69], encontraron que en compostas durante el metabolismo del TNT se producen metabolitos que se sabe son tóxicos y mutagénicos al formar complejos con otros compuestos presentes en las compostas {Figura IV.33} y al parecer intervienen factores como el pH y la humedad [64].

FIGURA IV.33

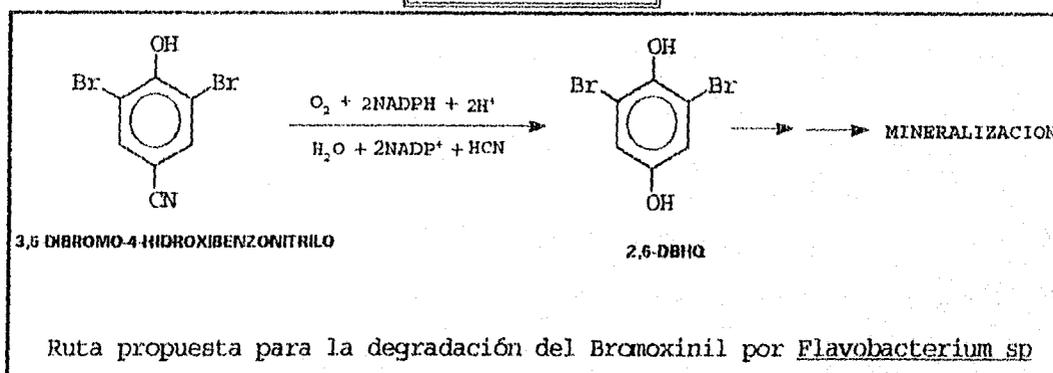


IV-5.2.7 Nitrilos.- El 3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo (bromoxinil) es un herbicida selectivo de contacto usado en una gran variedad de cosechas. Actúa como desacoplante de la fosforilación oxidativa y ha sido detectado en la vertiente de ríos proveniente de los desagües de localidades agrícolas. Los ésteres de bromoxinil contenidos en varias formulaciones de herbicidas son rápidamente convertidos a fenol en tierras húmedas. La vida media es de varios días y la biodegradación es el principal mecanismo de disipación [95].

La cepa de *Flavobacterium sp* ATCC 39723 degrada al bromoxinil por medio de la misma enzima que degrada al PCP debido a que el bromoxinil posee una estructura semejante al PCP. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* usa el bromoxinil como fuente de nitrógeno pero no como fuente de carbono, acumulando 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato como producto final del metabolismo.

El metabolismo es iniciado por la acción de la PCP hidrolasa la cual desplaza el grupo ciano sustituyente en la posición 4 con un grupo hidroxilo produciendo 2,6-DBHQ {Fig. IV.34}. El intermediario 2,6-DBHQ es entonces propuesto para la mineralización por una reacción inespecífica catalizada por un grupo de enzimas co-inducidas por PCP o bromoxinil.

FIGURA IV.34



La conversión de bromoxinil a dibenzo hidroxiquinona (DBHQ) sin la producción de bromuro sugiere que la enzima ataca específicamente en posición *para* y que por lo tanto, el mecanismo de deshalogenación y cianogénesis son similares.

La producción de cianuro tiene efectos tóxicos sobre el metabolismo de las células, por lo cual se sugiere usar este mecanismo de descontaminación de derrames de bromoxinil sólo en los casos en donde la concentración del herbicida sea baja [144].

IV-5.2.8.- Nitrosaminas.- El primer reporte sobre las propiedades carcinogénicas de las nitrosaminas fue dado en 1956 por Barnes investigando compuestos nitrosos (CNOs). Subsecuentes investigaciones reportaron que existía una relación entre la estructura de la nitrosamina y el órgano afectado (efectos organo-específicos).

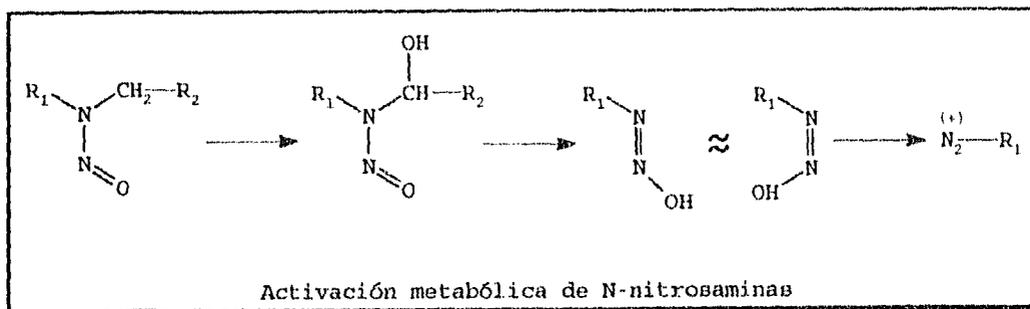
Se observó que un pequeño cambio en la estructura de la nitrosamina (grupos sustituyentes en las dos cadenas laterales ya fueran simétricos o asimétricos) producían diferentes efectos carcinogénicos organo-específicos en ratas {Tabla IV-5.1 }.

TABLA IV-5.1

PROPIEDADES CARCINOGENICAS DE DIALQUILNITROSAMINAS			
NITROSANIMAS SIMETRICAS		NITROSAMINAS ASIMETRICAS	
ESTRUCTURA	SITIO DEL TUMOR	ESTRUCTURA	SITIO DEL TUMOR
R1 = Metilo R2 = Metilo	Hígado	R1 = Metilo R2 = Etilo	Esofago Hígado
R1 = Etilo R2 = Etilo	Hígado	R1 = Etilo R2= Trifluoroetileno	Esofago
R1 = Propilo R2 = Propilo	Hígado	R1 = Metilo R2 = N-butilo	Esofago
R1 = N-butilo R2 = N-butilo	Vejiga urinaria Hígado	R1 = Etilo R2 = N-butilo	Esofago
R1 = N-pentilo R2 = N-pentilo	Hígado	R1 = Metilo R2 = Hexilo	Esofago
		R1 = Metilo R2 = Heptilo- No impar de átomos de Carbono	Esofago Hígado Pulmón
		R1 = Metilo R2 = Octilo - No pares de átomos de Carbono	Vejiga urinaria

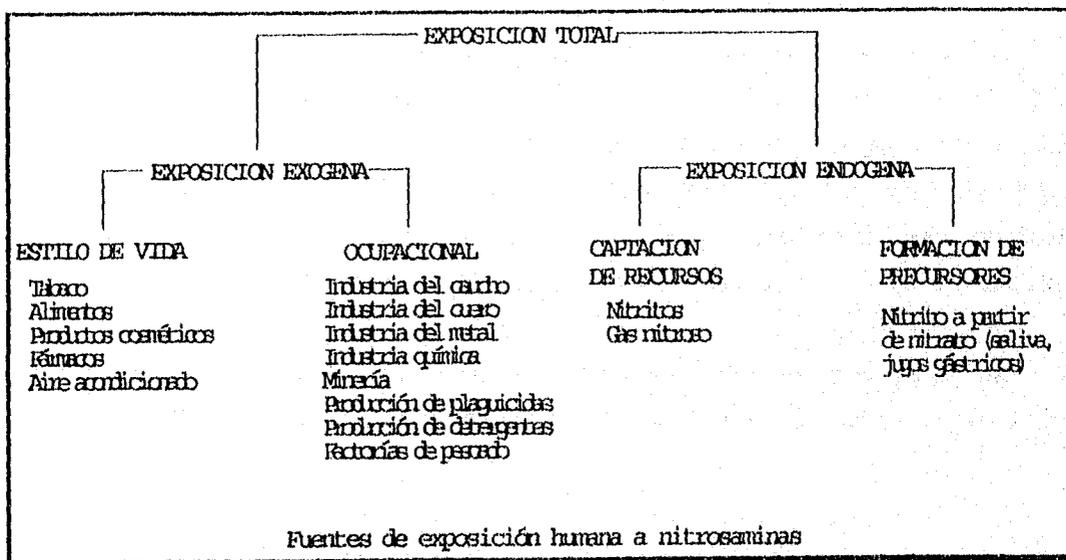
Las nitrosaminas por sí mismas no son carcinogénicas, sino que requieren de activación metabólica por α -oxidación {Figura IV.35} para formar α -hidroxinitrosaminas. Estas reacciones enzimáticas son mediadas por el citocromo P-450 (ver apartado III-2.1, página 48).

FIGURA IV.35



La exposición exógena ha sido extensamente monitoreada usando técnicas analíticas altamente específicas y selectivas. La alta exposición humana ocurre en ciertas situaciones ocupacionales {Figura IV.36} tales como en la industria del caucho y por el uso de fluidos contaminados con nitrosaminas dentro de la industria metalúrgica [114].

FIGURA IV.36

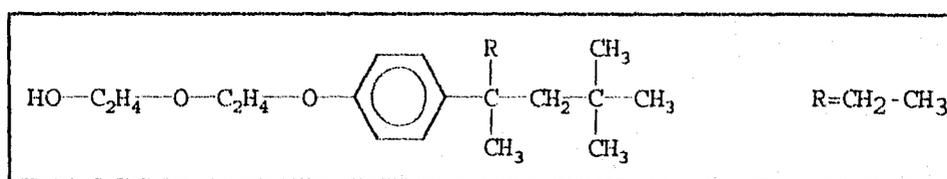


IV-6 BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS N-ALQUILADOS

IV-6.1 COMPUESTOS PARTICULARES

IV-6.1.1 Etoxilatos de Alquilfenol (EAFs).- Los etoxilatos de alquilfenol (EAFs) son del tipo de surfactantes polioxiétilenos no aniónicos que tienen principalmente aplicaciones industriales más que domésticas. Los EAF se dividen en dos grupos según el número de átomos de carbono en la cadena alquílica: etoxilatos de octilfenol y etoxilatos de nonilfenol (NFEs) {Figura IV.37}.

FIGURA IV.37



A los EAFs se les ha reconocido como compuestos de considerable poder refractario. En realidad, aún no se ha reportado su completa degradación, aunque la degradación parcial ocurre exclusivamente en las regiones hidrofílicas: por ejemplo en las cadenas de óxido de etileno (OE). También se ha encontrado que la cadena más corta de OE de un EAF se origina como resultado de la biodegradación. Sin embargo los productos de degradación del EAF tienden a la bioacumulación en algunos organismos y se cree que es debida a la estabilidad de estos compuestos.

Se han aislado bacterias de lodos activados de una planta de tratamiento de desechos por medio de un cultivo enriquecido que tienen la habilidad para degradar la cadena OE. [65].

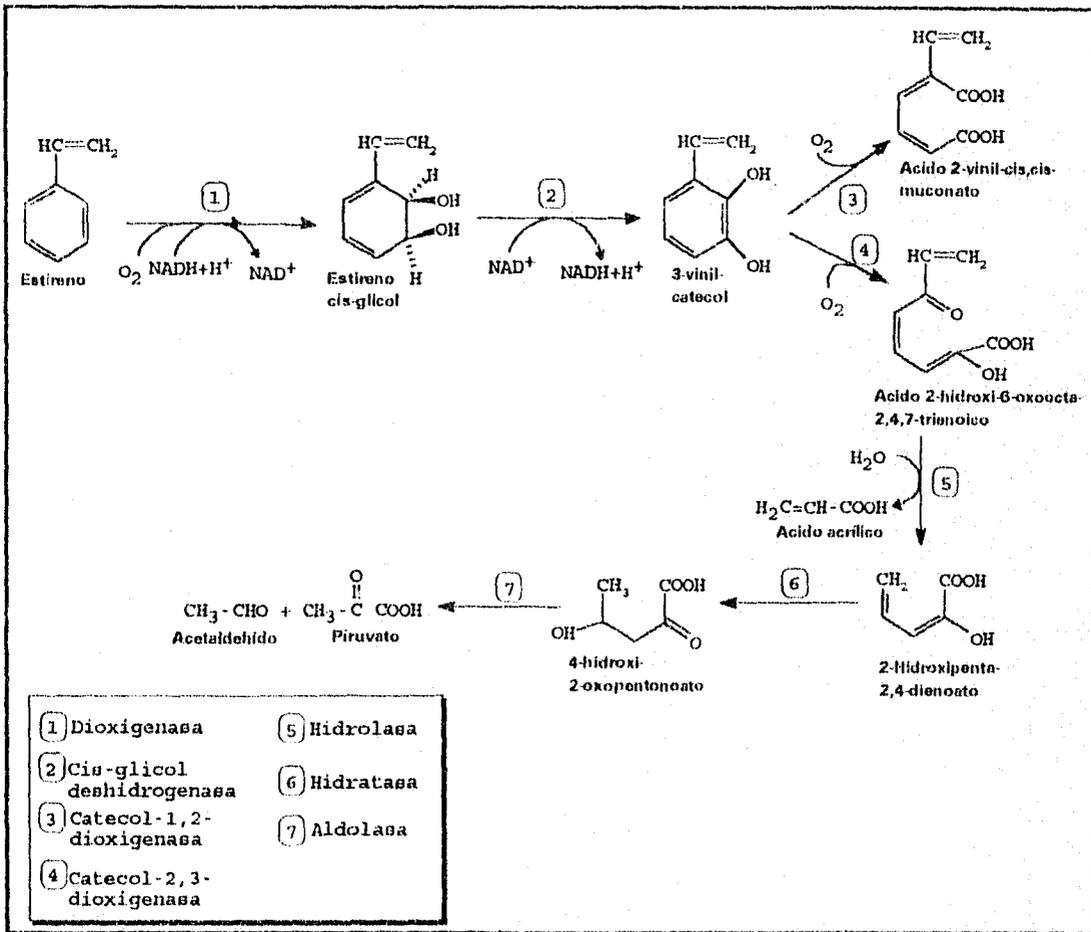
IV-6.1.2 Estireno.- El estireno (feniltileno, vinilbenceno) corresponde al grupo químico de los arenos (contienen partes tanto aromáticas como alifáticas); es el alquilbenceno más sencillo y recibe el nombre de estireno. Tiene muchos usos, tales como en la manufactura de poliestireno, plásticos y

goma de estireno-butadieno. Es uno de los productos químicos aromáticos más importantes producidos en la industria [93,148].

La liberación de estireno por el hombre puede ocurrir por diferentes vías que incluyen aguas de desecho de fábricas, evaporación y pirólisis del poliestireno. En la naturaleza, el estireno es usualmente producido por descarboxilación del ácido cinámico, que es un ácido común en las plantas. *Penicillium caseicola* puede sintetizar estireno.

La especie *Rhodococcus rhodochrous* metaboliza estireno por la ruta que procede vía cis-glicol {Figura IV.38}.

FIGURA IV.38

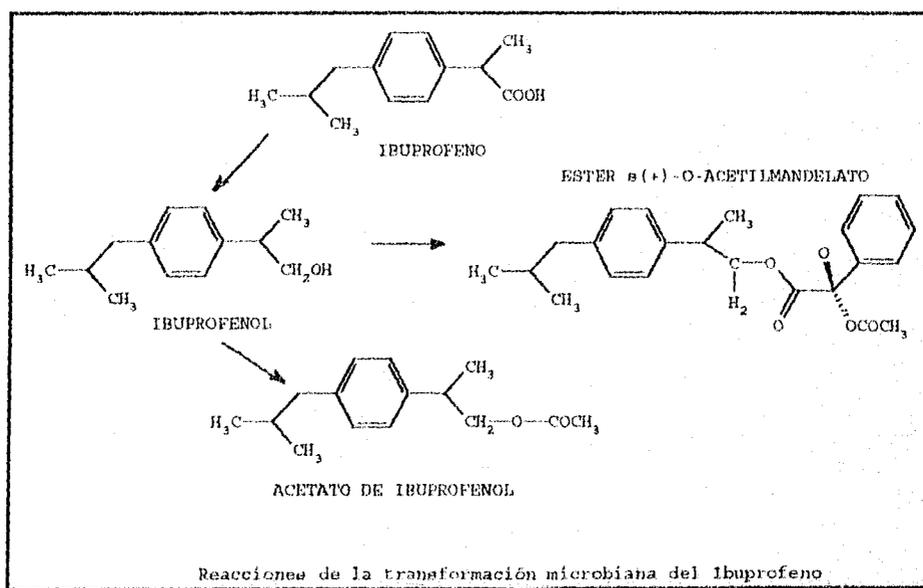


El metabolismo se inicia por medio de una dioxigenación que lleva a estireno *cis,cis*-glicol seguido de una deshidrogenación para formar 3-vinilcatecol el cual experimenta una orto-fisión no productiva que forma 2-vinil-*cis,cis* muconato como producto final; pero el metabolismo se completa con una meta-fisión por la 2,3-catecol dioxigenasa para dar un compuesto amarillo, identificado tentativamente como el ácido 2-hidroxi-6-oxoocta-2,4,7-trienoico. Este producto es atacado por la enzima hidroximuconato semialdehído hidrolasa que produce ácido acético y 2-hidroxipenta-2,4-dienoato que es transformado a 4-hidroxi-2-oxopentanoato por una hidratasa y subsecuentemente se metaboliza hasta acetaldehído y piruvato [148].

IV-6.1.3 Ibuprofeno.- El ibuprofeno es un potente agente antiinflamatorio no esteroideo, antipirético y analgésico. Su modo de acción es por medio de la interferencia de la producción de prostaglandinas (mediadores de la inflamación). A bajas dosis el ibuprofeno es analgésico pero sin considerables efectos antiinflamatorios [33,56].

En el ser humano, el ibuprofeno es metabolizado por oxidación para formar dos metabolitos inactivos, (+)-2³4¹-(2-hidroxi-2-metilpropil)fenil³ propionato (metabolito A) y (+)-2³4¹-(2-carboxipropil) fenil³ propionato (metabolito B) [141].

FIGURA IV.39



El grupo funcional correspondiente al ácido carboxílico del ibuprofeno es reducido al correspondiente alcohol y subsecuentemente esterificado al derivado acetato [Figura IV.39] por cultivos de *Nocardia* NRRL.5646 [33].

iv-6.1.4 Sulfonatos de alquil benceno.- La degradación biológica de los bencenos alquilados involucra diversos aspectos que comprenden la rapidez y magnitud de la biodegradación.

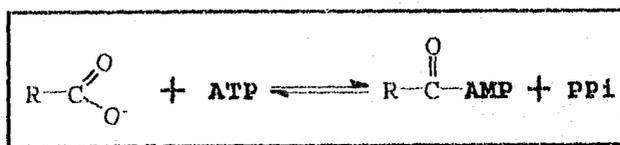
Un aspecto de la degradación de estos compuestos es que es más fácil degradar a los sulfonatos de alquilo lineales (LAS) que a los sulfonatos de alquilo ramificados (BAS). Esto se atribuye a la resistencia del BAS, derivado del polipropileno que posee una estructura ramificada del grupo alquilo en contraste con el LAS que presenta menor resistencia a la degradación microbiana por tener una estructura alifática lineal [82].

También se ha observado que existe una relación entre la posición del grupo fenilo en la cadena alifática; entre mayor sea la distancia entre el grupo sulfonato y el extremo hidrofóbico, es mayor la velocidad de biodegradación del BAS. La degradación de tales compuestos puede hacerse a través de tres procesos que son [9]:

1.- **OXIDACION OMEGA.-** Consiste en la adición de oxígeno molecular a la cadena alifática catalizados por una oxigenasa para dar un hidroxiperóxido, un aldehído y un ácido tricarbóxico [101].

2.- **OXIDACION BETA.-** En este mecanismo se presentan una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente semejantes a la oxidación β de ácidos grasos en el metabolismo intermediario:

1.- El ácido graso reacciona con ATP para formar un aciladenilato



II.- El grupo sulfidriilo de la CoA ataca entonces al aciladenilato, el cual está fuertemente unido a la enzima, para formar acil-CoA y AMP.

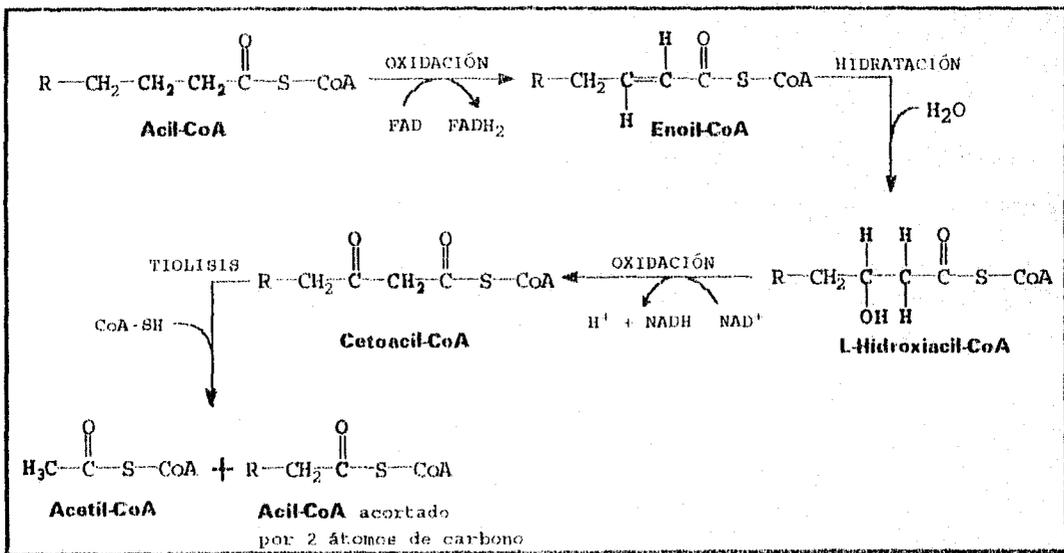


III.- La cadena alquílica activada así, al igual que un ácido graso como un acil-CoA saturado se degrada mediante una secuencia repetitiva de 4 reacciones:

- 1) Oxidación ligada a la flavina adenina dinucleótido (FAD).
- 2) Hidratación.
- 3) Oxidación ligada al NAD⁺
- 4) Tiólisis por CoA.

Como resultado de estas reacciones la cadena alquílica se acorta en dos átomos de carbono y se genera FADH₂, NADH y acetil-CoA {Figura IV.40}.

FIGURA IV.40



Si la cadena alquílica es insaturada, solamente son necesarias dos nuevas enzimas, una isomerasa y una epimerasa, cuando la doble ligadura está involucrada en la serie de cuatro reacciones [135].

3.-DEGRADACION DEL ANILLO BENCENICO.- Muchos investigadores suponen que ocurre un rompimiento en el anillo con la cadena parcialmente oxidada; otros autores proponen que necesita efectuarse una oxidación completa de la cadena o quizá, que primero se efectúa la eliminación del grupo sulfonato para que el anillo aromático sea degradado [101].

Pseudomonas putida S-313(=DSM 6884) tiene la habilidad para degradar los surfactantes tipo LAS mientras crece en un medio libre de sulfatos y los utiliza como única fuente de carbono y de energía. Se trata de los surfactantes 2-(4-sulfonil)butirato, 4-n-butil-1-metil-6-sulfotetralina y al 4-toluensulfonato que son completamente metabolizados. Los productos de degradación en cada caso fue el correspondiente fenol y 4-cresol en el caso del 4-toluensulfonato.

El metabolismo inicia con la ω -oxigenación de la cadena alquílica seguida de una serie de pasos de β -oxidación los cuales dan un producto intermediario de sulfonilcarboxilato. La desulfonación y ruptura del anillo aromático es el siguiente paso de la ruta de degradación [70]

IV-6.1.5 Tolueno.- El tolueno es el más sencillo de los alquilbencenos. Este compuesto puede ser degradado bajo condiciones desnitrificantes. El 80% del carbono proveniente del tolueno es oxidado a CO_2 o puede ser asimilado como carbono celular (biomasa) por una bacteria desnitrificante (cepa T1); del 20% restante, una porción significativa es transformada en dos metabolitos finales (potencialmente tóxicos) que se producen durante su mineralización, tales metabolitos han sido identificados como ácido bencilsuccínico y ácido bencilfumárico [93,45].

La ruta común propuesta durante la transformación del tolueno a ácido bencilsuccínico y ácido bencilfumárico por la cepa T1 se ilustra en la figura IV.41 (ruta superior), la cual procede vía adición de cuatro carbonos.

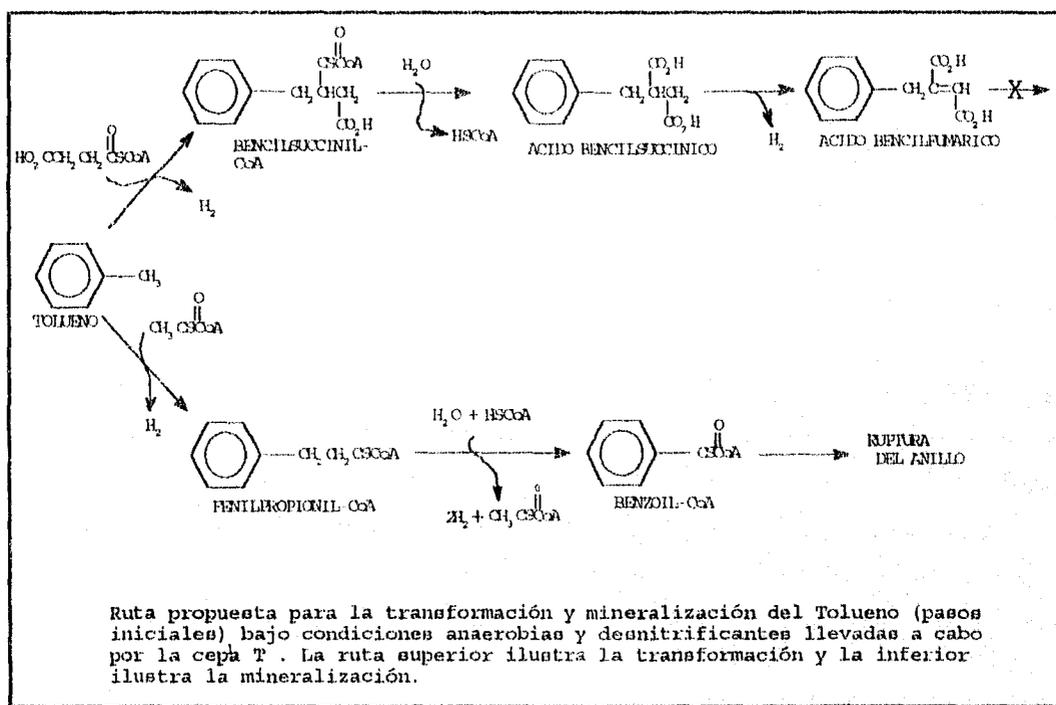
El grupo metilo del tolueno es ligeramente electrofílico debido a la naturaleza desactivante (quitar electrones) del anillo aromático. De esta forma, el grupo metilo es adecuado para ser

atacado por succinil-CoA, un nucleófilo fuerte, para formar bencilsuccinil-CoA, que es subsecuentemente hidrolizado para formar ácido bencilsuccínico el cual es oxidado para formar ácido bencilfumárico. En la ruta inferior {Figura IV.41} se muestran los pasos iniciales durante la mineralización que opera simultáneamente con la transformación del tolueno.

El primer paso involucra un ataque nucleofílico al grupo metilo del tolueno por acetil-CoA para formar fenilpropionil-CoA, el cual, vía β -oxidación, produce benzoil-CoA, el cual es sujeto a la ruptura del anillo y a la oxidación [45].

La degradación anaeróbica del tolueno también se ha propuesto a través de fenol el cual puede ser subsecuentemente oxidado a benzaldehído. [73,80].

FIGURA IV.41



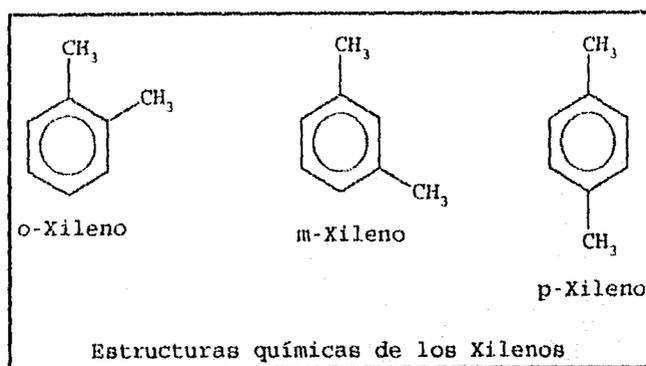
IV-6.1.6 O-Xileno.- Los dialquibencenos más simples, los dimetilbencenos, reciben los nombres comunes de xilenos, dando o-xileno, m-xilenos y p-xilenos {Figura IV.42} [93].

El o-xileno es un compuesto relativamente recalcitrante a la biodegradación bajo condiciones aerobias y anaerobias. Sin embargo, las transformaciones incompletas tienen un lado potencialmente negativo ya que los metabolitos formados pueden ser más tóxicos que el compuesto químico original fuente de la contaminación. Aunque la identificación de estos metabolitos puede proveer información sobre su toxicidad, su formación y como se inicia su mineralización todavía no es clara.

La transformación del o-xileno, que produce metabolitos análogos con un grupo metilo adicional (ácidos 2-metilbencil succínico y 2-metilbencil-fumárico) a los metabolitos identificados en el tolueno, podría sugerir una ruta idéntica a la degradación del Tolueno.

La cepa T1 aislada de un cultivo anaerobio crecida en Tolueno puede transformar al o-xileno pero no lo mineraliza, lo cual puede ser el resultado de la baja especificidad enzimática [45].

FIGURA IV.42



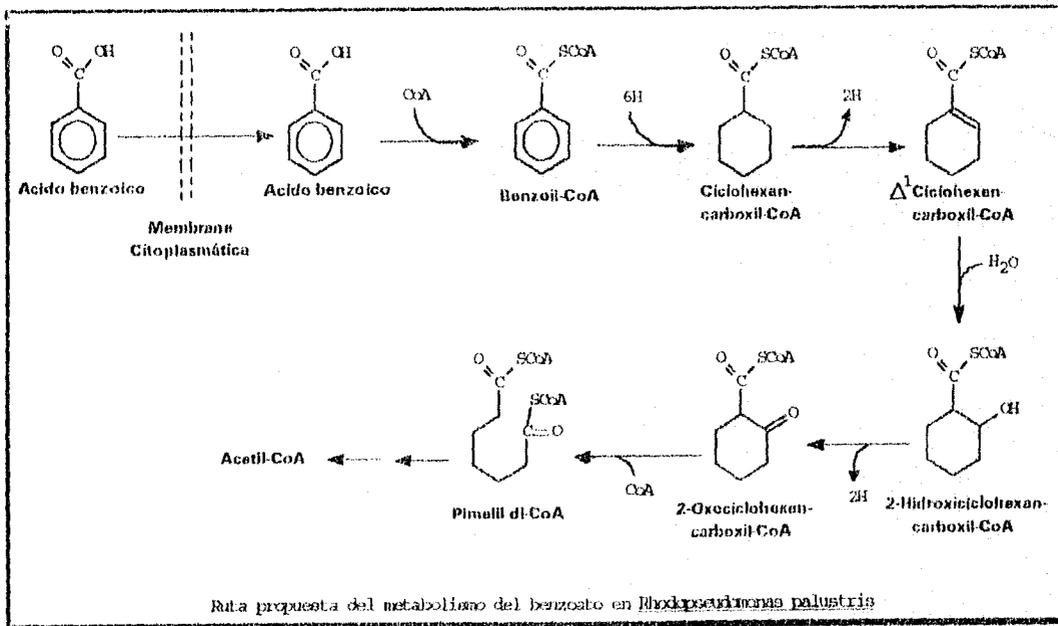
IV-7 BIODEGRADACION DE ACIDOS AROMATICOS Y FENOLES

IV-7.1 COMPUESTOS CARBOXILADOS

IV-7.1.1 Acido Benzoico.- Diferentes especies de la familia *Rhodospirillaceae*, bacterias púrpuras no sulfúreas, las cuales pueden obtener energía de la luz o de la respiración aerobia, crecen anaerobicamente en la luz a expensas de compuestos aromáticos simples como única fuente de carbono [37,46].

En 1968 se identificaron cinco intermediarios en el metabolismo fotosintético del ácido benzoico por otra especie bacteriana identificada como *Rhodopseudomonas palustris* y con estos hallazgos se propuso la ruta de degradación de éste ácido aromático, que se supone es realizada a través de β -oxidación de los ácidos grasos {Figura IV.43}, como se comprobó más tarde todas las enzimas necesarias para el metabolismo de ácidos grasos de cadena corta fueron encontradas en un extracto celular de las mencionadas bacterias.

FIGURA IV.43



El transporte del ácido benzoico a través de la membrana se lleva a cabo sin gasto de energía. El ácido benzoico, también puede ser metabolizado por bacterias reductoras de nitratos que acoplan la oxidación de compuestos orgánicos con agua para la reducción exergónica de nitrato vía nitrito a N_2 , o menos frecuente a NH_3 . La energía se deriva principalmente de la fosforilación del transporte de electrones durante el proceso respiratorio del nitrato, y el carbono celular se deriva de la degradación de los compuestos orgánicos.

Las especies bacterianas que metabolizan el ácido benzoico por el mecanismo anterior, se identificaron como *Pseudomonas stutzeri* y *Moraxella sp.* La ruta procede por la descarboxilación oxidativa del benzoato a catecol por la ruta orto (ver página 102).

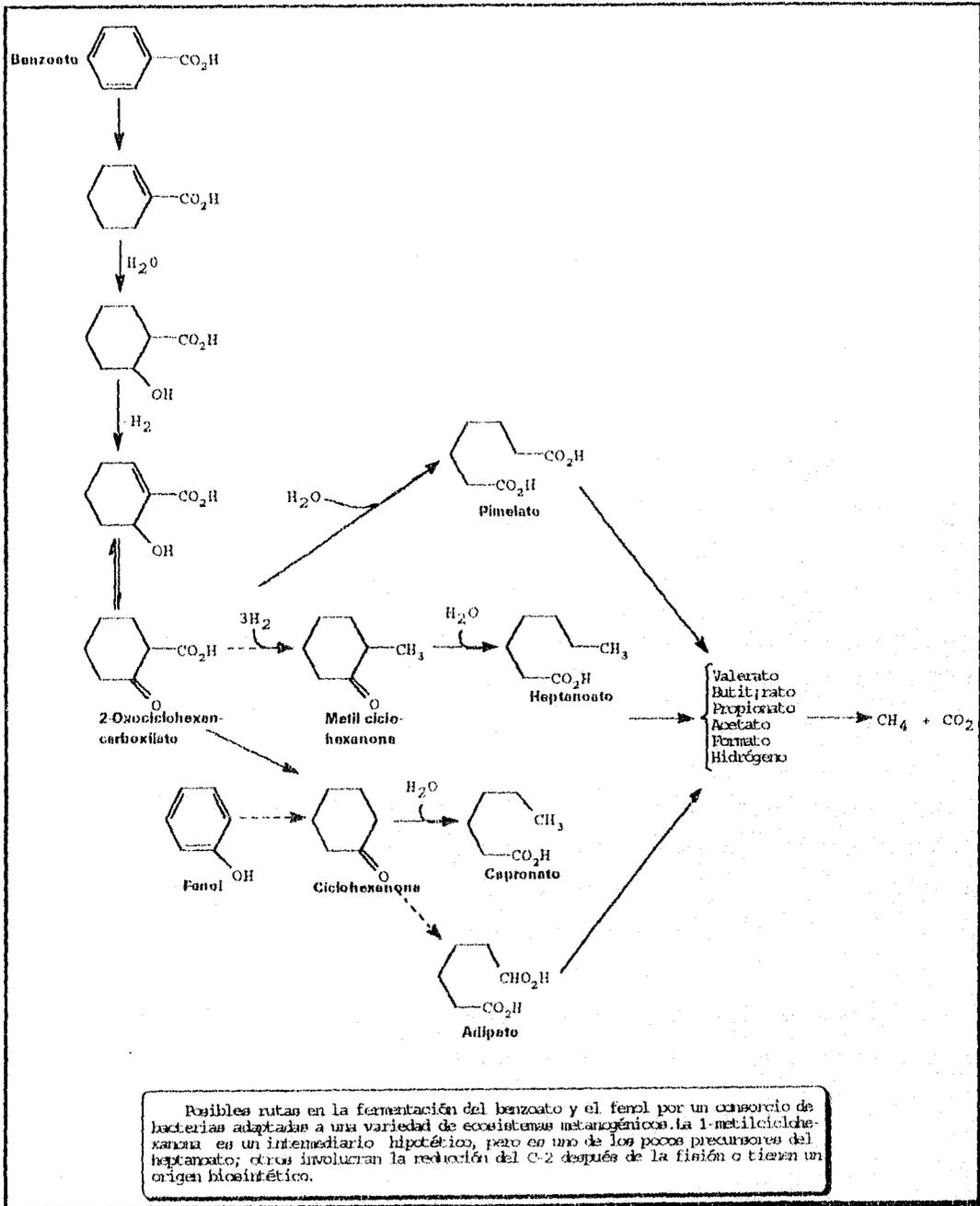
El primer paso en la reducción bioquímica del benzoato es su activación a través de su conversión a benzoil-CoA por una ligasa inducible.

Se han identificado especies bacterianas reductoras de sulfatos que oxidan compuestos orgánicos (benzoatos entre otros), con la reducción de sulfato vía sulfito a sulfuro. La energía la derivan igual que las bacterias reductoras de nitratos, de la cadena de transporte de electrones pero ahora durante la reducción de sulfito. Los reductores de sulfatos son los principales degradadores de compuestos orgánicos en los ambientes marinos. La asociación simbiótica de *Desulfovibrio vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa* pueden metabolizar al benzoato con la reducción de sulfato.

El benzoato también puede ser metabolizado por un consorcio metanogénico indefinido, en donde el benzoato es primero reducido, probablemente como ester de la CoA, seguida de una secuencia de β -oxidaciones, ruptura del anillo y formación de ácidos alifáticos; con la subsecuente formación de acetato, formato y CO_2 {Figura IV.44}.

Alcaligenes xylooxidans subespecie *denitrificans* metaboliza aeróbicamente al p-hidroxibenzoato a través de la ruta del protocatecato por meta-fisión [46]

FIGURA IV.44



Possible rutas en la fermentación del benzoato y el fenol por un consorcio de bacterias adaptadas a una variedad de ecosistemas metano-genicos. La 1-metilciclohexanona es un intermediario hipotético, pero es uno de los pocos precursores del heptanoato; otros involucran la reducción del C-2 después de la fisión o tienen un origen biosintético.

IV-7.1.2 Antranilato.- Especies de *Pseudomonas* son capaces de metabolizar el 2-aminobenzoato (antranilato) aerobíamente mientras crece en una mezcla de antranilato con benzoato. En presencia de nitrato, fueron metabolizados hasta CO_2 con la concurrente reducción del NO_3^- a NO_2^- ; sólo después del consumo completo del NO_3^- fue el NO_2^- reducido a N_2 [46].

IV-7.2 COMPUESTOS HIDROXILADOS

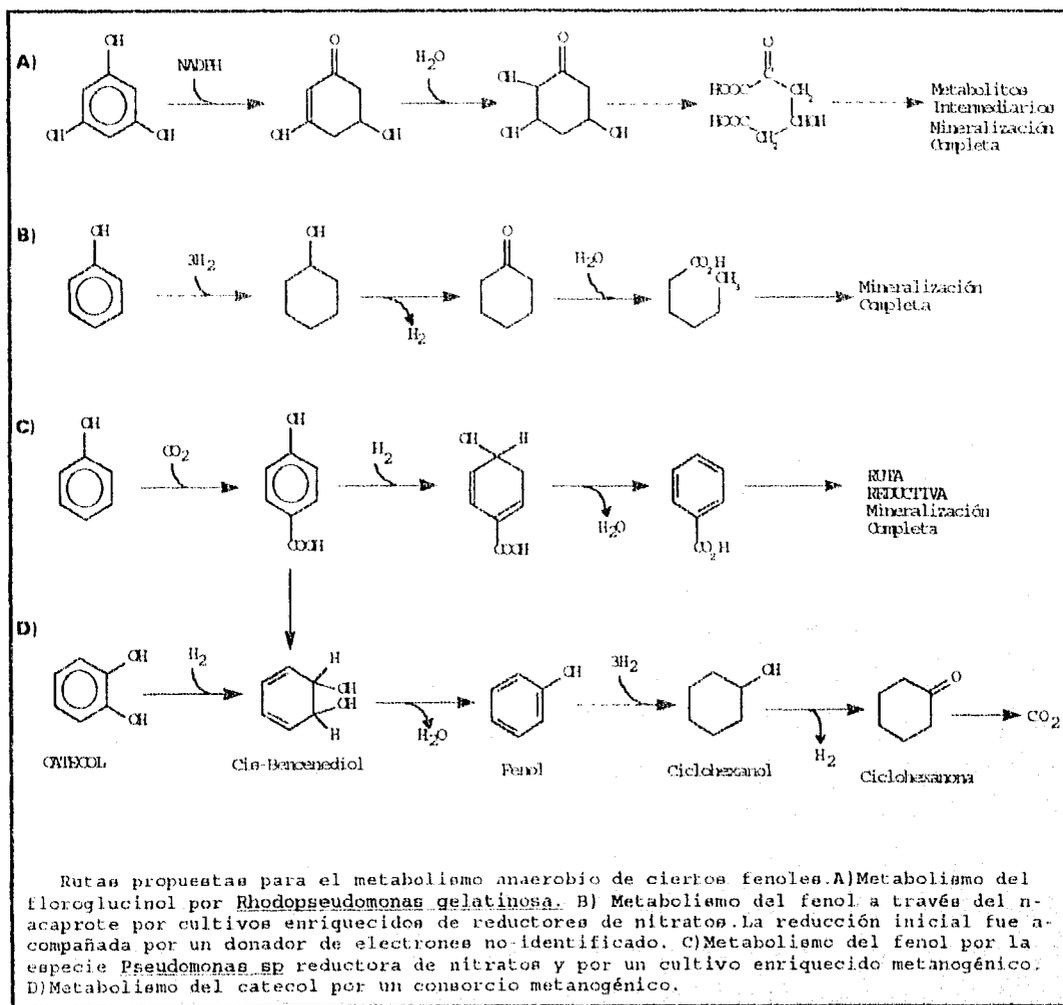
IV-7.2.1 Fenol.- Algunos microorganismos por ejemplo, la especie *Nocardia rubra*, participan en la depuración de las aguas residuales que contienen fenol procedente de la industria química o de centros hospitalarios y lo degradan con rapidez en las estaciones cálidas del año [119].

Pseudomonas sp. y *Spirillum sp.* son capaces de metabolizar al fenol y al cresol bajo condiciones anaeróbicas en un medio de sal-nitrato-mineral. El fenol es reducido a ciclohexanol el cual es deshidrogenado a ciclohexanona, que sufre una fisión del anillo para producir n-caproato {Figura IV.44 y IV.45}.

IV-7.2.2 Cresol.- El p-cresol es metabolizado vía oxidación anaerobia produciendo 4-hidroxibenzoato {Figura IV.45}. En aguas marinas, se ha usado la técnica de marcaje usando tritio (^3H) para la evaluación de la biodegradación en ambientes marinos contaminados con p-cresol, probando que la mineralización es completa obteniéndose CO_2 y $^3\text{H}_2\text{O}$ [13,46].

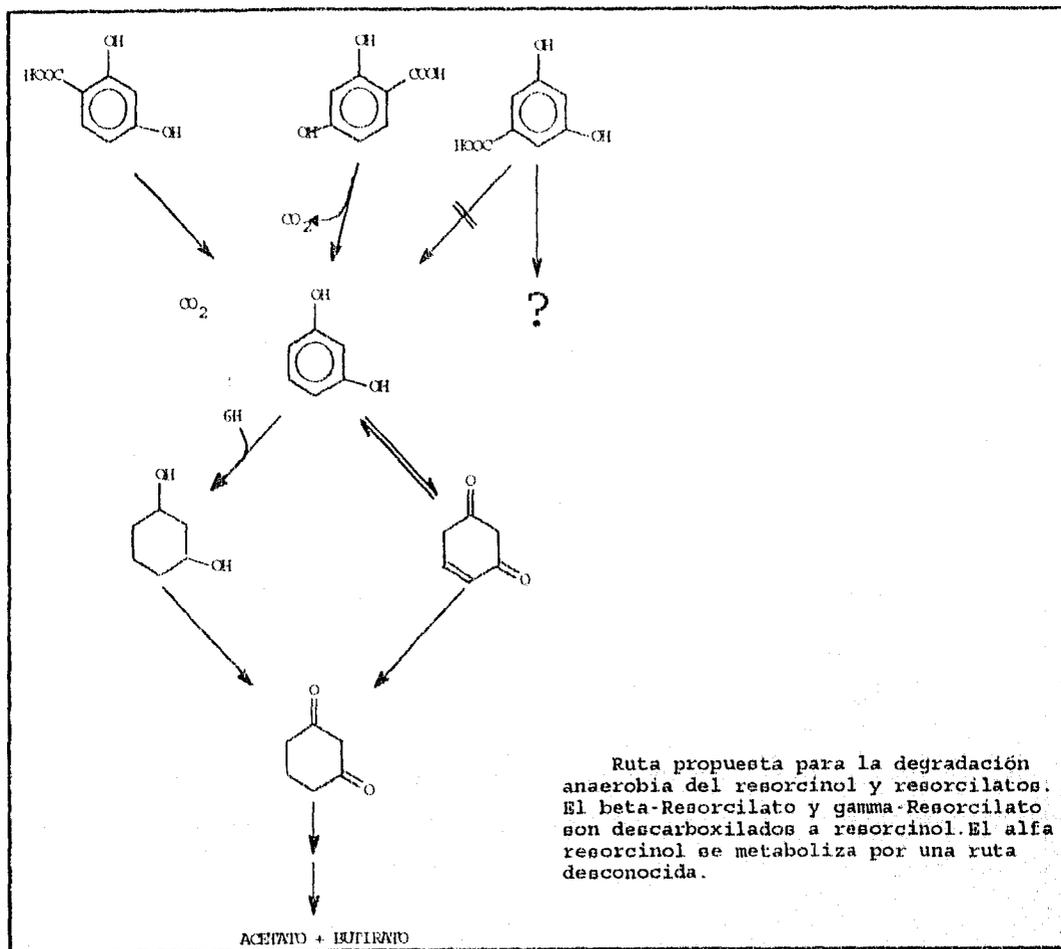
IV-7.2.3 Resorcinol.- El resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) al igual que los ácidos α, β, γ -resorcílicos son completamente degradados. El ácido alfa-resorcílico fue metabolizado a acetato y metano. El resorcinol fue metabolizado por medio del proceso fermentativo por *Clostridium sp.* en cocultivo con *Campylobacter sp.* produciendo acetato y butirato {Figura IV.46} [14].

FIGURA IV.45



IV-7.2.4 Hidrobenzoato.- *Desulfovibrio vulgaris*, un microorganismo metanogénico, o *Acetobacterium woodii* pueden degradar al hidroxibenzoato a través de la vía reductiva de deshidroxilación por medio del benzoato hasta acetato y metano [46].

FIGURA IV.46



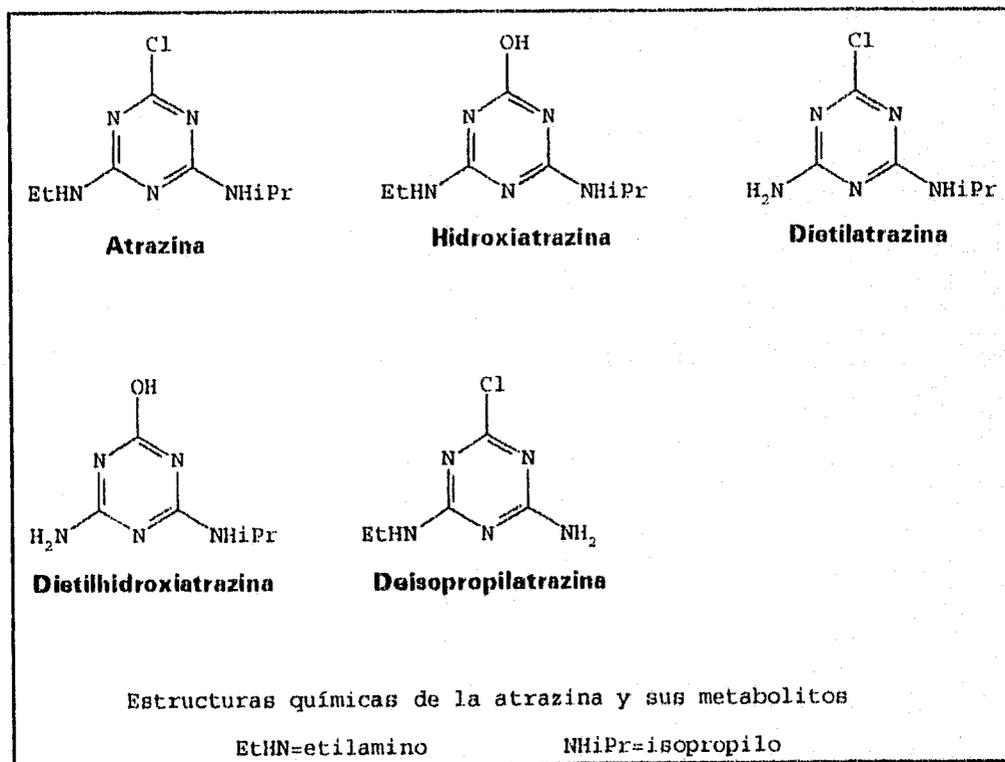
IV-8 BIODEGRADACION DE COMPUESTOS HETEROCICLICOS

IV-8.1 COMPUESTOS PARTICULARES

IV-8.1.1 Atrazina.- La atrazina [2-cloro-(etilamino)-6-(isopropilamino-1,3,5-triazina] es uno de los herbicidas más ampliamente usados en el mundo para el control de la mala hierba en maíz y sorgo.

El grupo etilo del herbicida puede ser mineralizado por el hongo de la podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*. Durante el metabolismo de la atrazina hay formación de metabolitos hidroxilados y/o N-dealquilados {Figura IV.47}.

FIGURA IV.47

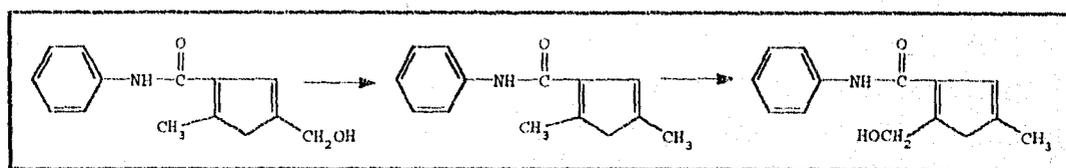


La dealquilación parece ser el principal y primer mecanismo involucrado en la degradación microbiana de cloro-s-triazinas. El hongo elimina el grupo etilo de la atrazina preferentemente al grupo isopropilo. Los metabolitos dialquilados ya no se metabolizaron [94].

Más recientemente se aisló un microorganismo identificado como *Pseudomonas sp* ADP de un consorcio microbiano que tiene la capacidad de degradar Atrazina mientras crece en un medio de cultivo mínimo con atrazina como única fuente de nitrógeno. Los átomos de carbono de la atrazina fueron liberados como CO₂ [85].

IV-8.1.2 BAS.- Se ha encontrado que se metaboliza por los hongos *Rhizopus japonicus*, *R. nigricans*, *R. peka* y dos cepas de *Mucor*. El metabolismo inicia con la hidroxilación de los dos grupos alfa-metilos del BAS {Figura IV.48} y el producto resultante ya no se metaboliza [2].

FIGURA IV.48

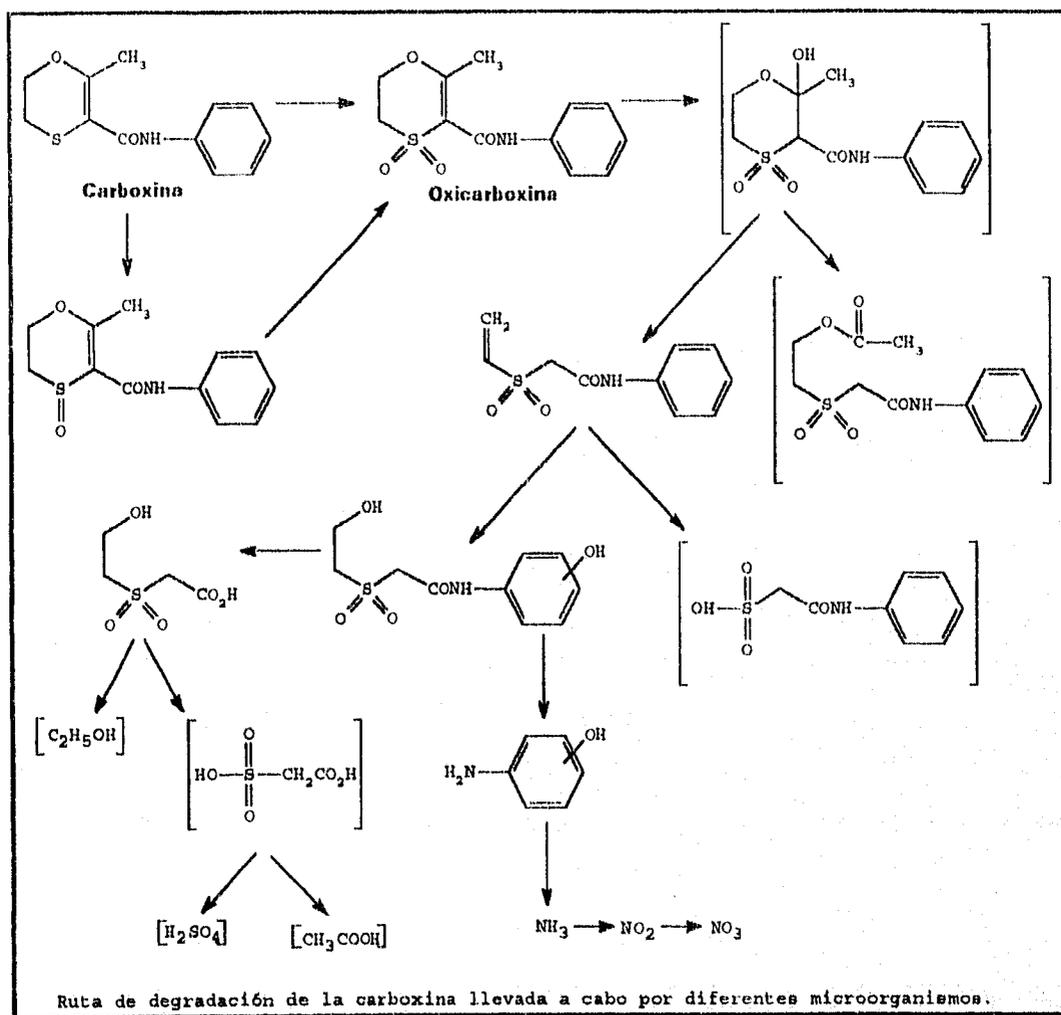


IV-8.1.3 Carboxina.- Las bacterias hidrolizan la oxicarboxina vía intermediarios 2-(vinilsulfonil)acetanilida, liberando ácido 2-(2-hidroxietilsulfonil)acético y aminofenol, mientras que la carboxina primero es oxidado a su sulfóxido y después hidrolizado. Además, la hidrólisis del aminofenol produce la acumulación de amonio, el cual es parcialmente oxidado a nitrito {Figura IV.49}.

Los microorganismos involucrados en esta transformación son *Pseudomonas aeruginosa*, el alga verde *Chlorella vulgaris*, y *Rhodospirillum sp.*, además de necesitar

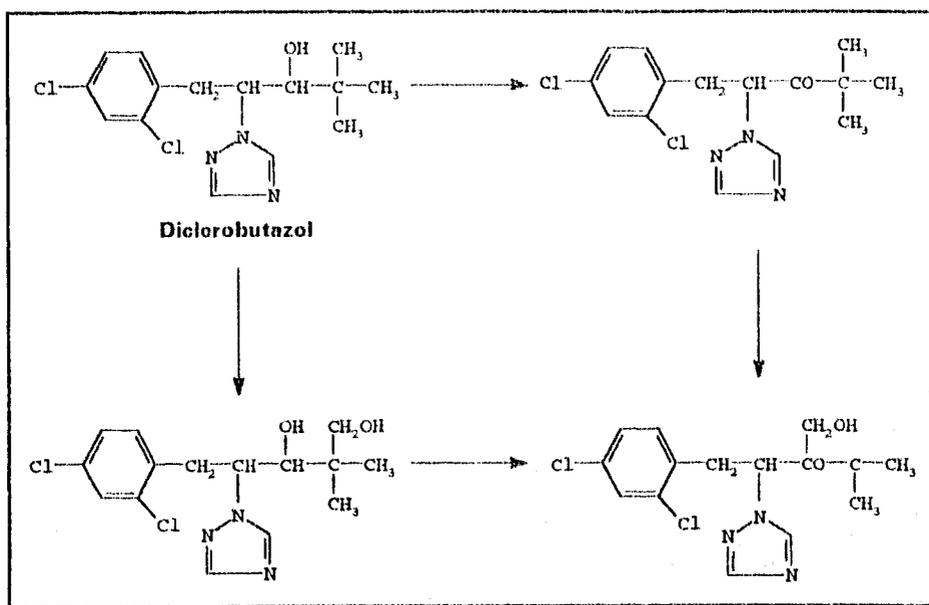
ciertas condiciones en el suelo (pH) para que la transformación de la carboxina se lleve a cabo [2].

FIGURA IV.49



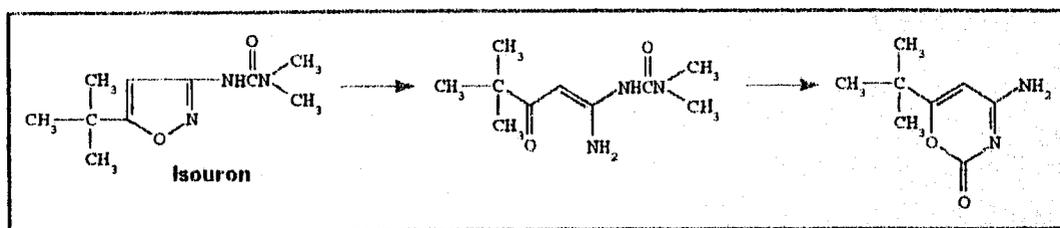
IV-8.1.4 Diclorobutazol.- La formación de un metabolito en forma de alcohol primario, es una posible ruta de destoxicación del diclobutazol y su oxo análogo {FiguraIV.50}. Tal destoxicación es realizada por los basidiomicetos *Coriolus versicolor* y *Rhizoctonia solani* [2].

FIGURA IV.50



IV-8.1.5 Isouron.- El isouron {Figura IV.51} es un herbicida. Existen dos principales rutas de degradación que involucran N-desmetilación e hidroxilación del grupo ter-butilo. La ruptura del anillo isoxazol es observada en el metabolismo por el hongo *Hansenula saturnos* en el suelo, dando 1-(1-amino-4,4-dimetil-3-oxo-1-pentenil)-3,3-dimetilurea, 1,1-dimetil-3-(2-pivaloylacetil)urea y 4-amino-6-ter-butil-2H-1,3-oxazin-2-ona. Otro microorganismo involucrado en el metabolismo del isouron es el hongo *Rhizoctonia solani* cepa F2, F3 y F4 [2].

FIGURA IV.51



IV-9 BIODEGRADACION DE COMPUESTOS POLIAROMATICOS

Los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) representan una clase de compuestos químicos muy esparcida en el medio ambiente. Aparecen en la naturaleza como constituyentes naturales y como productos de la combustión de combustibles fósiles. Los principales contaminantes incluyen una variedad de compuestos tóxicos y genotóxicos, siendo el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenol)etano (DDT), bifenilos policlorados (PCBs) y los para-clorobifenilos (p-CBs) los de mayor interés por su persistencia en el medio ambiente. [59,32].

La degradación microbiana representa la ruta principal de transformación y remoción de los PAHs en el medio ambiente, y la explotación de estos procesos naturales en la remediación de los sitios contaminados se ha presentado como una alternativa prometedora a los tratamientos físicos [59].

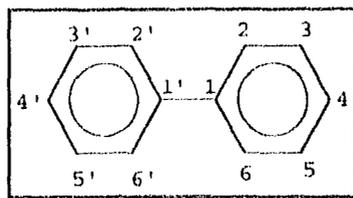
IV-9.1 BIFENILOS POLICLORADOS

El medio ambiente ha sido contaminado con una variedad de xenobióticos que incluyen a los PCBs, como resultado del desarrollo industrial del uso de los compuestos halogenados. Al mismo tiempo los PCBs no exhiben la toxicidad aguda originalmente atribuída a ellos y sus bioproductos [14].

Fueron citados en la literatura por primera vez en el año de 1881, por H. Schmidt y G. Shults; pero no fue sino hasta el año de 1930 cuando la compañía Swuan tuvo éxito al sintetizarlos, iniciándose al mismo tiempo su producción y uso a nivel industrial [88].

Los PCBs se denominan genéricamente "Askarales", son hidrocarburos aromáticos, {Fig IV.52} en los cuales los átomos de hidrógeno de la molécula bifenílica son reemplazados por átomos de cloro [29].

FIGURA IV.52



Los bifenilos que se encuentran en México fueron importados principalmente de los Estados Unidos, siendo el productor más importante de este país la compañía Monsanto Chemical, que los introdujo al mercado con el nombre de Aroclor. Un total de 1.2 millones de toneladas de PCBs se fabricaban en todo el mundo antes de que su producción fuera suspendida. Se estima que más del 30% de este producto ha sido liberado al medio ambiente, principalmente en sitios de relleno sanitario. [92].

Los PCBs tienen 209 isómeros posibles en teoría, pero sólo cerca de 100 existen en formulaciones comerciales. Estas formulaciones son insolubles en agua, no polares, solubles en lípidos y son inertes. Estas propiedades los hicieron atractivos para emplearlos en la industria. Los PCBs se utilizaron comercialmente a partir de 1930, en diversas aplicaciones, siendo la principal su empleo como medio aislante y de enfriamiento; son conocidos como retardadores de la ignición en los transformadores (reducen o incrementan el voltaje de las líneas de potencia) y capacitores eléctricos (ayudan a mantener el voltaje constante durante la transmisión de potencia) [32,74,31].

Se usaron también en ceras, aditivos, adhesivos, flúidos para intercambiadores de calor, bombas de vacío, pinturas plastificantes, tintas para impresión, plaguicidas, medicinas, agentes antimicrobianos, papel copia (no de carbón), aditivos en aceites lubricantes y de corte, flúidos hidráulicos y agentes desengrasantes, hasta que su producción fue prohibida en 1979 [32,29,139].

Una vez en el medio ambiente, entran a los seres vivos almacenándose en el tejido adiposo y de ahí son transferidos al siguiente eslabón de la cadena alimentaria en concentraciones crecientes. Debido a esto no pueden ser introducidos en los ciclos naturales sin que causen trastornos y alteren las características de los ecosistemas de la tierra [92].

Son absorbidos por los mamíferos a través del sistema gastrointestinal, pulmón y la piel para ser acumulados en tejido adiposo. A medida que ascienden por la cadena alimenticia, se observa una pérdida progresiva de los componentes menos clorados debido a la biotransformación selectiva; en grasas humanas sólo se advierten indicios de PCBs que contienen menos de cinco átomos de cloro por molécula (a esto se le denomina persistencia, la cual aumenta con el grado de cloración).

Los efectos sobre la salud del ser humano debidos a la exposición de PCBs se han identificado como porfiria, inmunodepresión o interferencia con el metabolismo de los esteroides, teratogénesis (malformación del feto); es probable que algunos de estos efectos sean atribuídos al aumento de la actividad enzimática microsómica, vinculado con hepatomegalia. Algunos de los efectos tóxicos se pueden atribuir a impurezas en productos comerciales [108,139].

IV-9.2 METABOLISMO DE LOS PCBs

La degradación de los PCBs es mediante fisión del anillo y deshalogenación y ésta se ha demostrado que sucede tanto en sistemas aerobios como anaerobios.

Algunas bacterias aerobias o facultativas aisladas del medio ambiente son capaces de utilizar PCBs. La especie *Pseudomonas cruciviae* puede crecer en más de 10 compuestos bifénlicos relacionados que incluyen al p-CB y degradar al difenil éter mediante la ruta de orto-fisión y al bifenilo mediante meta fisión (ver página 102) [32].

IV-9.2.1 Sistemas aerobios.- Se ha estudiado la degradación metabólica de diversas clases de BPCs a través de cepas bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas* aislada de sedimentos de ríos y cultivadas en 4-clorobifenilo y bifenilo como única fuente de carbono. Los bifenilos poco clorados son fácilmente degradados por cultivos puros y mixtos con otras especies bacterianas [48].

Dos especies de *Acinetobacter* han podido metabolizar PCBs generando diversos clorobenzoatos como producto en un reactor aerobio de lecho fijo con un soporte de poliuretano y con benzoato de sodio como sustrato primario. Los clorobenzoatos se identificaron como 4,4'-diclorobifenilo (4,4'-DCBP), 3,4-diclorobifenilo (3,4-DCBP), y el 3,3',4,4'-triclorobifenilo (3,3',4,4'-TCBP) [1].

El uso de cocultivos para lograr la mineralización de BPC, ha resultado ser una alternativa cuando una sola especie bacteriana no posee los sistemas enzimáticos necesarios para lograr la degradación completa del xenobiótico de interés. Por ejemplo, cuando un cultivo puro fue cultivado en 4-clorobifenilo usualmente lo metaboliza a clorobenzoato que no se metaboliza, pero la mineralización se logra a partir de un cultivo mixto obtenido de sedimentos de ríos contaminados con PCBs. *Alcaligenes sp*, por ejemplo posee un plásmido (pSS50) que media esta mineralización [23].

En otro experimento, la degradación del 4-clorobifenilo, se realiza en dos pasos. La primera fase emplea la cepa *Arthrobacter sp* M5 la cual transforma al 4-clorobifenilo a 4-clorobenzoato y en el segundo paso se empleó *Pseudomonas aeruginosa* 4-CBA que crece en 4-clorobenzoato en presencia del emulsificador β -ciclodextrina a 15 g/l. La cepa 4-CBA produce un inhibidor del crecimiento de la cepa M5; así, la deshalogenación fue optimizada cuando se deja por cuatro días crecer a M5 y después se inocula a la cepa 4-CBA que utiliza el producto transformado previamente [63].

IV-9.2.2 Sistemas anaerobios.- Los PCBs son eliminados del medio ambiente por medio de una combinación de las actividades aerobias y anaerobias, de esta forma, conociendo el comportamiento de los microorganismos bajo estas diferentes condiciones, se podrán emplear mejor la combinación de técnicas para la completa eliminación de los PCBs. Los PCBs actúan como verdaderos vertederos de electrones, con la eliminación de cloro como producto y sin la alteración del esqueleto carbonado, siendo la deshalogenación reductiva de los PCBs, un proceso importante para la biorremediación de sedimentos contaminados [118,152].

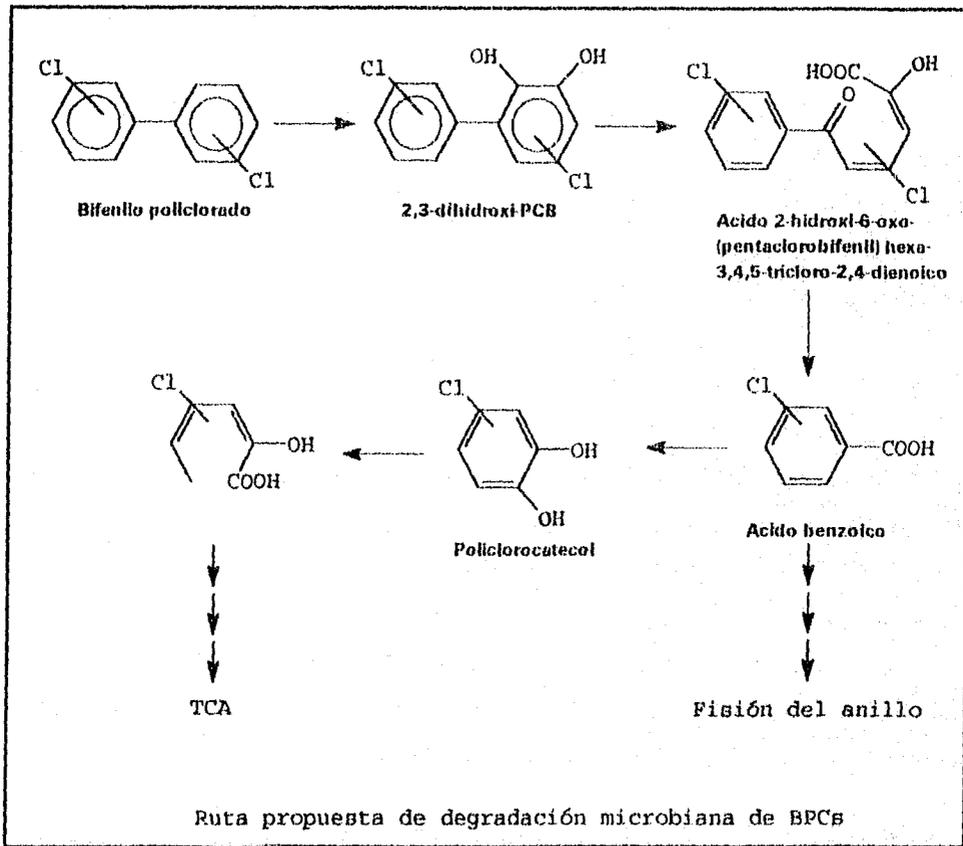
En 1983 se reportó que la única ruta conocida para la destrucción ambiental del PCB más altamente clorado era la fotólisis provocada por radiaciones del ultravioleta cercano, pero

los PCBs que permanecen en los sedimentos acuáticos son obviamente inaccesibles a la luz solar. Generalmente, sólo pocos centímetros de los sedimentos son aerobios; los más grandes reservorios de BPC en los ríos son ambientes anaerobios [142].

Las bacterias anaerobias de estos sitios, convierten los compuestos más altamente tóxicos a metabolitos menos clorados que los organismos aerobios de la superficie pueden rápidamente metabolizar a clorobenzoatos. Frecuentemente, los compuestos más clorados son sólo parcialmente metabolizados por organismos aerobios vía meta-fisión [63].

En la figura IV.53 se ilustra la vía aerobia y anaerobia de degradación de los PCBs. La ruta está basada en la detección de metabolitos [32].

FIGURA IV.53

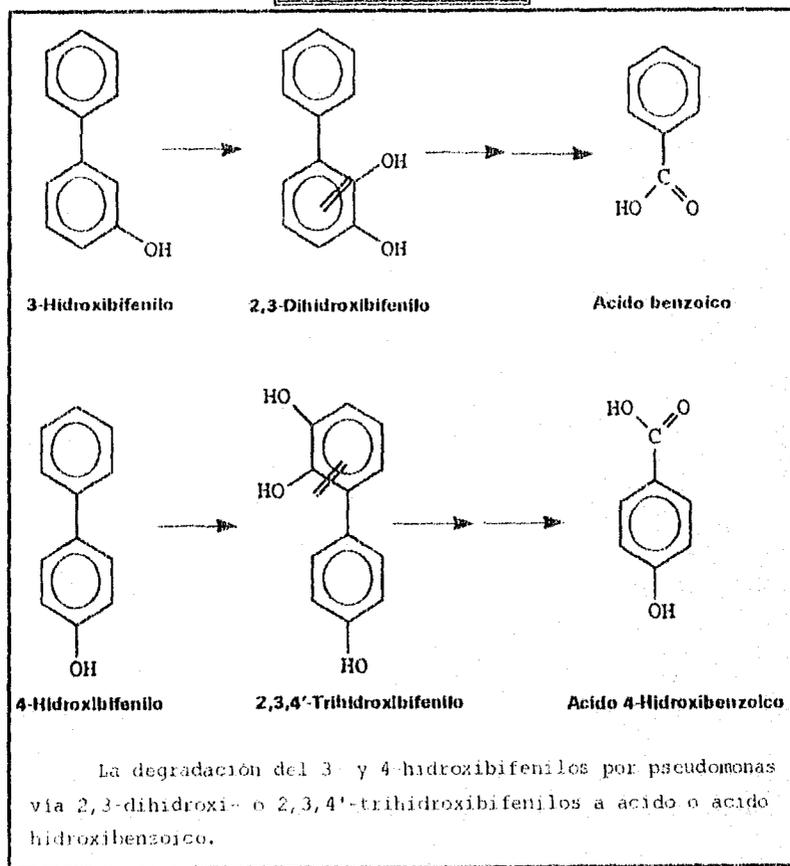


IV-9.3 BIODEGRADACION DE OTROS DERIVADOS DE BIFENILOS

Los bifenilos policlorados fueron usados en 1970 como retardantes de la combustión, hasta que sus efectos sobre el metabolismo hepático y su actividad teratogénica prohibió su uso. Siendo menor el problema causado por este xenobiótico comparado con los problemas ocasionados por los PCBs; su degradación ha recibido menor atención. Dos cepas microbianas aisladas del suelo que fueron identificadas como *Alcaligenes sp.* KF708 y *Pseudomonas paucimobilis* KF706 son capaces de crecer en 2-bromo y 2-nitrobifenilo, al igual que en difenilmetano y en bifenilo [31].

La degradación de bifenilos hidroxilados es llevada a cabo por el género *Pseudomonas*, que fue aislada de agua de alcantarilla, que utiliza al 2- o 3-hidroxibifenilo como única fuente de carbono; la monohidroxilación en cada caso generó 2,3-dihidroxibifenilo, el cual sufrió meta fisión {Figura IV.54}. *Pseudomonas sp.* FH23 convierte al 4-hidroxibifenilo a 4-hidro-

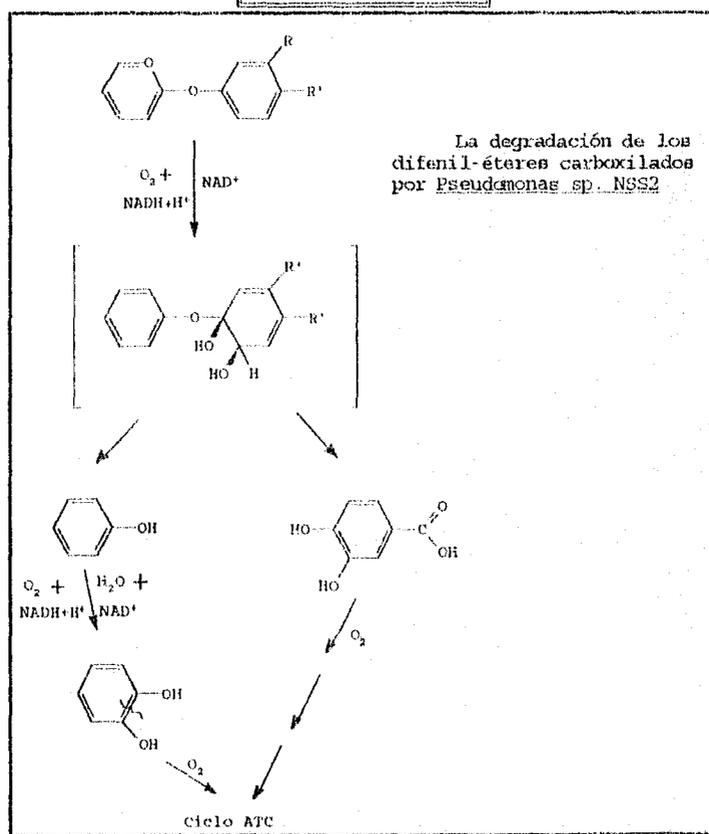
FIGURA IV.54



xibenzoato. Esta misma cepa no puede metabolizar al 4,4'-dihidroxibifenilo, ya que a pesar de que el impedimento estérico para el ataque del oxígeno podría ser grande y la solubilidad en agua de los compuestos doblemente sustituidos es baja, es más factible el hecho de que la 3,4-dioxigenación no es productiva.

Pseudomonas cepacia puede crecer en difeniléter como única fuente de carbono produciendo hidroxiderivados. Este metabolito intermediario es metabolizado al 2-pirano-6-carboxilato y fenol por meta fisión y ruptura del éter. Se piensa que se hace una cis-tautomerización en el mismo paso de la ruptura del anillo, sin la participación de intermediarios libres. Para la degradación del herbicida Cloridazon (5-amino-4-cloro-3-fenil-2-H-piridazin-3-ona. *Pseudomonas sp.* NSS2, usa al 3-carboxibifenilo o 4-carboxibifenil éter como única fuente de carbono. Se propone que una dioxigenasa es la responsable de generar un dihidrodiol para después generarse un fenol y el protocatecato {Figura IV.55}.

FIGURA IV.55

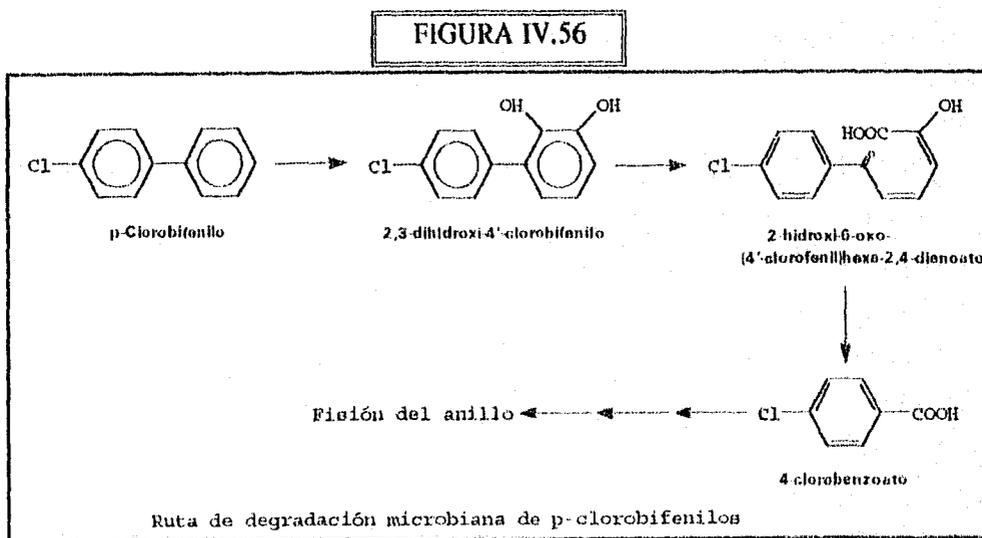


Este es un mecanismo alternativo al clásico ataque de las monooxigenasas en el grupo alquilo de los éteres para producir hemiacetales que se hidroliza espontáneamente a aldehídos y fenoles [63].

IV-9.3.1 Metabolismo de bifenilos por hongos y cianobacterias.- Otras especies investigadas en el metabolismo de bifenilos abarcan a la especie *Helicostylium piriforme* QM6945 tiene la capacidad para hidroxilar selectivamente a los bifenilos en la posición 2. La especie *Cunninghamella echinulata* realiza la formación de 3,4-óxido de bifenilo. *Nocardia salmonicolor* 21243 realiza una meta hidroxilación en bifenilos. Finalmente, la cianobacteria *Oscillatoria sp* JCM realiza una para-hidroxilación cuando es iluminada mientras crece en un medio enriquecido de CO₂ que permite el crecimiento fotoautotrófico [63].

IV-9.3.2 P-Clorobifenilos.- La especie *Acinetobacter sp* es capaz de utilizar p-clorobifenilos (p-CBs). La degradación de este compuesto es codificada por el plásmido pKF1 (82 kb) o por el plásmido pSS50 (53 kb) de *Alcaligenes sp*, sin embargo, la información sobre estos plásmidos es limitada.

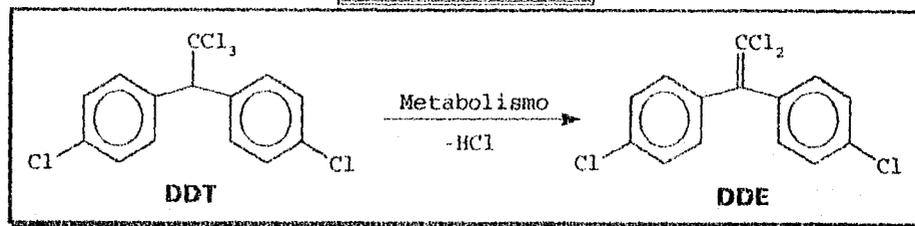
Acromobacter sp. y *Bacillus brevis*, utilizan p-CB formando como producto principal de degradación al 4,4-diclorobifenilo {Figura IV.56}. El p-CB es convertido a 4-clorobenzoato (4-CBA) después de ocurrir la deshalogenación.



Pseudomonas sp. es capaz de utilizar al p-CB como única fuente de carbono y energía. La degradación metabólica es diferente a la ruta anterior, y la 4-cloroacetofenona podría ser el producto final [32].

IV-9.3.3 Biodegradación del DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenol)etano)- En muchos casos, un metabolito es más persistente que el compuesto químico que le dió origen. Así, el 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenol)etano (DDE) que es un metabolito del DDT {Figura IV.56} es más recalcitrante. Ambos, el DDT y el DDE son altamente lipofílicos y débilmente polares, lo cual conlleva un alto potencial de penetración en los tejidos animales [109].

FIGURA IV.56

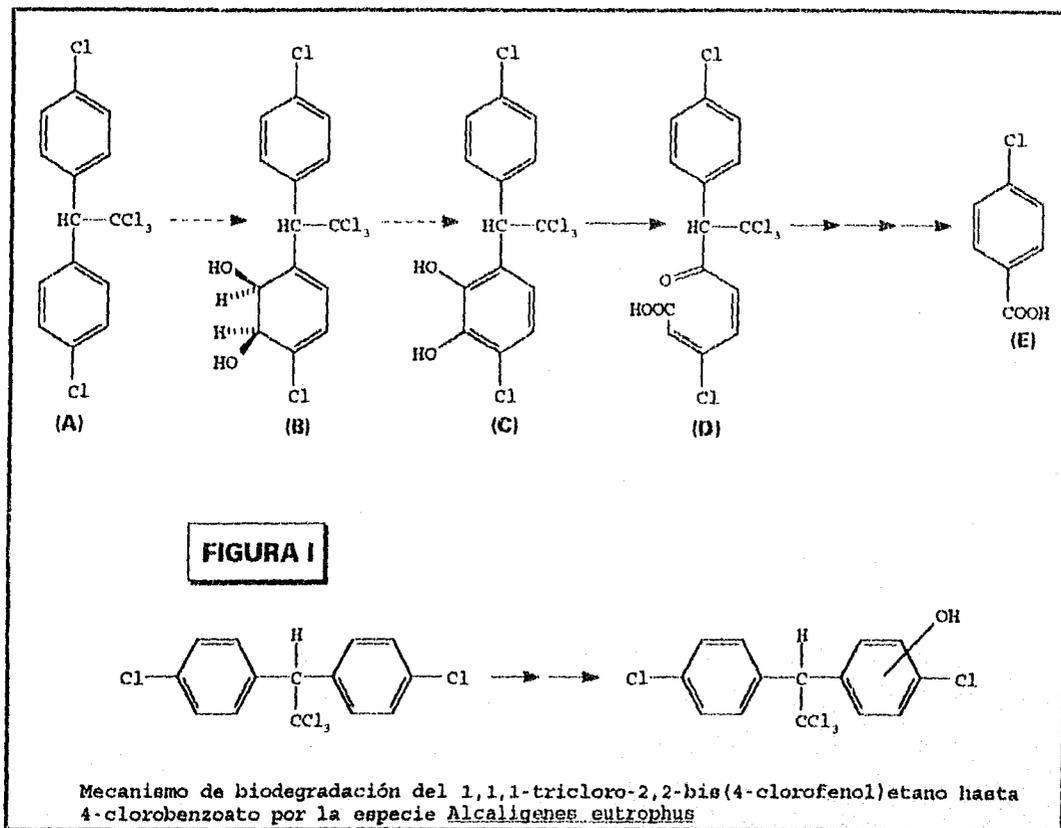


A pesar de que el DDT es un contaminante ambiental muy esparcido. Parece sufrir una lenta degradación llevada a cabo por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* que degrada la lignina y utiliza al DDT como fuente de nitrógeno. La ruta principal metabólica es a través de una oxidación seguida de un proceso de deshalogenación para finalmente llevar a la formación de CO₂ [32].

Bajo condiciones anaerobias el DDT se descompone por cultivos mixtos bacterianos a través de una deshalogenación reductiva del grupo etano ó por deshalogenación a DDE. Mientras que el DDE fue el producto final, el compuesto formado en la deshalogenación reductiva del grupo etano fue más degradado por pasos secuenciales que involucran la descloración reductiva e hidroxilación en el grupo etano, resultando en la acumulación de diclorobenzofenona. Uno de los intermediarios de la ruta anaerobia, el p,p'-diclorofenilmetano, se convierte, por ruptura del anillo, al ácido p-clorofenilacético por *Hydrogenomonas sp.* bajo condiciones aerobias.

En un estudio más reciente [98] se reportó la degradación del DDT por *Alcaligenes eutrophus* A5 bajo condiciones aerobias {Figura IV.57}.

FIGURA IV.57



El paso inicial del catabolismo es la oxidación en el anillo fenólico del DDT (A) en las posiciones orto y meta para formar un intermediario 2,3-dihidrodiol-DDT (B), se propone que este es un ataque por dioxigenasas; este compuesto (dihidrodiol) es inestable y fácilmente deshidratado en dos compuestos hidroxilados (figura I) bajo condiciones ácidas. El dihidrodiol-DDT puede ser todavía degradado a 2,3-dihidroxi-DDT (C) por una deshidrogenasa. El compuesto C es metabolizado por meta fisión para formar un compuesto amarillo (D) el cual puede ser metabolizado a 4-CBA (E).

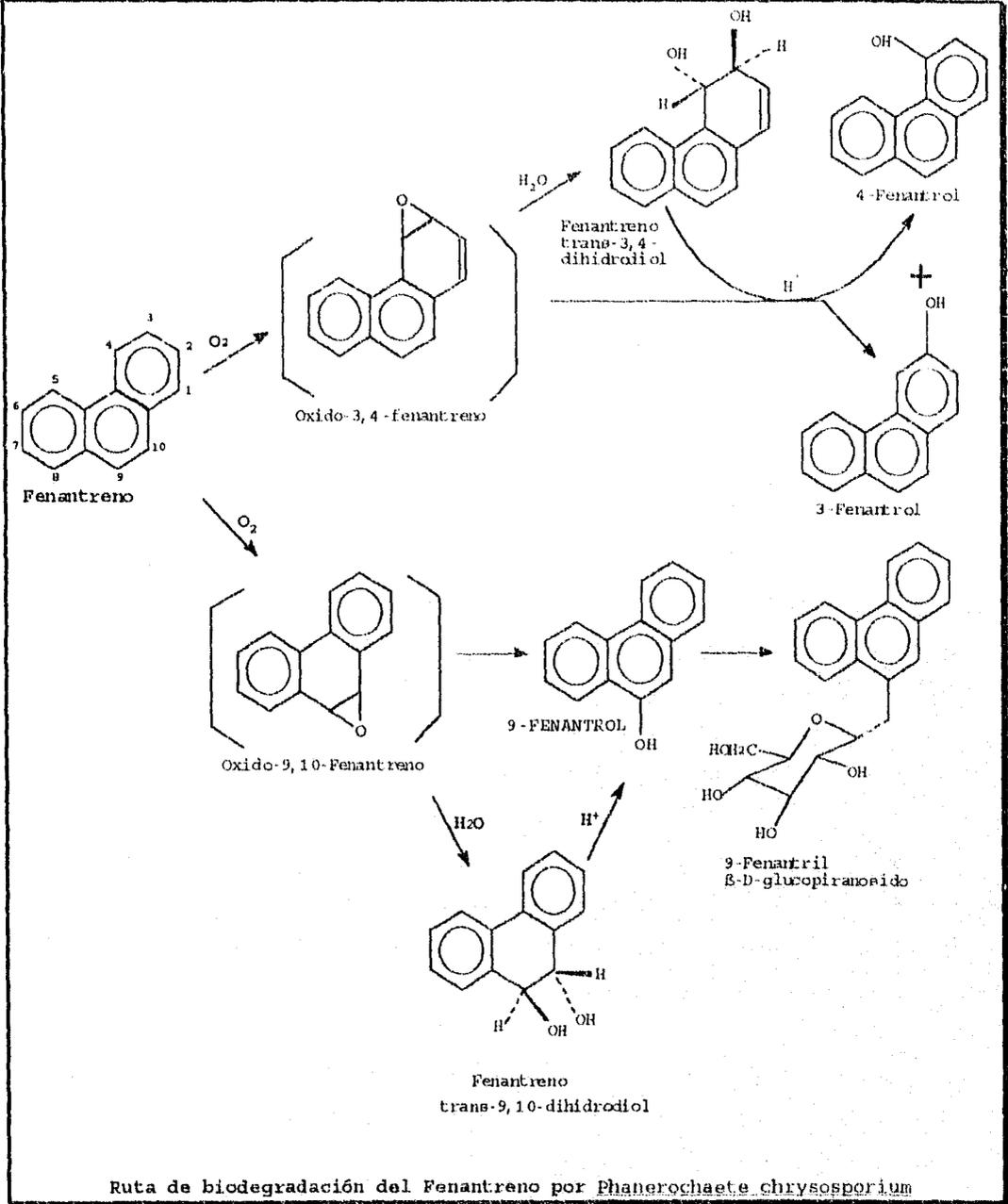
El producto de la apertura del anillo puede ser metabolizado a un ácido C-5 o C-6 dependiendo del sitio en donde tenga lugar la ruptura hidrolítica. El ácido clorado C6 se forma si la ruptura hidrolítica tiene lugar entre el carbono C1 y un carbono adjunto al anillo fenólico fisionado. El ácido clorado C5 se forma entre el C5 y C6 del anillo fenólico [98].

IV-9.3.4 Fenantreno.- Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), tales como el fenantreno, se encuentran comúnmente como contaminantes en suelos, agua de estuarios y sedimentos, y otros sitios terrestres y acuáticos. Este compuesto es tóxico para diatomeas marinas, gasterópodos, moluscos, crustáceos y pescados.

Diferentes bacterias, cianobacterias y hongos tienen la capacidad para degradar este tipo de xenobióticos. El zigomiceto *Cunninghamella elegans* oxida fenantreno al correspondiente compuesto trans-1,2-dihidrodiol y pequeñas cantidades del trans-3,4- y trans-9,10-dihidrodiol y un glucósido conjugado de 1-fenantrol. *Phanerochaete chrysosporium* puede degradar una gran cantidad de xenobióticos entre los cuales se encuentran algunos PAHs como el Benzo(a)pireno, pireno, fluoreno y el fenantreno [136].

El fenantreno puede ser mineralizado completamente hasta CO₂ [49,50], sin embargo, la ruta oxidativa completa no se ha esclarecido; se ha propuesto parte de ésta llevada a cabo por la especie *P. chrysosporium* {Figura IV.58}, en donde el fenantreno es oxidado a trans 9,10- y trans 3,4 dihidrodiol fenantreno por medio de la actividad sucesiva de monooxigenasas y epóxido hidrolasas. Los óxidos-3,4 y 9,10, no se pudieron aislar, sin embargo se cree que son intermediarios en el proceso ya que al ser inestables en medio acuoso se isomerizan a fenoles o son hidratados por epóxido hidrolasas al correspondiente trans-dihidrodiol el cual sufre una deshidratación produciendo un alcohol (3-, 4-, y 9-fenantrol). El isómero 9-fenantrol (débilmente mutagénico), produciendo un conjugado: 9-fenantril β-D-glucopiranosido (producto de destoxificación del fenentreno) [136,27].

FIGURA IV.58



IV-9.3.5 Fluoreno.- El fluoreno es uno de los compuestos aromáticos, más simples que poseen dos anillos aromáticos con un grupo bencil metilénico en un anillo central de cinco miembros. Es el componente principal de los combustibles fósiles y sus derivados (aproximadamente 7.6% de la creosota) y, junto con fluorenona y un número de alquil derivados, se ha detectado en emisiones de vehículos, partículas del aire y sedimentos marinos y de ríos. La estructura química del fluoreno tiene relación con otros contaminantes de interés (carbazoles, dibenzotiofenos, dibenzofuranos y dibenzodioxinas y sus derivados halogenados).

Se han hecho pocos estudios de la degradación del fluoreno. Un primer reporte sugirió que la biodegradación del fluoreno por *Arthrobacter sp.* puede proceder por dos diferentes rutas, una vía de monooxigenación del C-9 produciendo 9-fluorenona como metabolito final (dead-end); la otra ruta involucra dioxigenación vía meta-fisión de uno de los anillos aromáticos, con la posible involucración de un tipo de reacción biológica Baeyer-Villiger responsable de la formación de la hidrocumarina.

En reciente publicaciones, se ha reportado la biotransformación del fluoreno por el hongo *Cunninghamella elegans* vía monooxigenación del C-9 para llevar a fluorenol y después 9-fluorenona, con sucesiva monooxigenación para llevar a 2-hidroxifluorenona. Otros estudios indican la transformación del fluoreno por *Brevibacterium* cepa DPO 1361 que utiliza dibenzofurano vía monooxigenación del C-9 seguida de una dioxigenación angular en la posición 1,1a. La cepa DBF63 de *Staphylococcus auriculans* tiene un metabolismo similar produciendo 1- y 4-hidroxifluorenonas como productos finales.

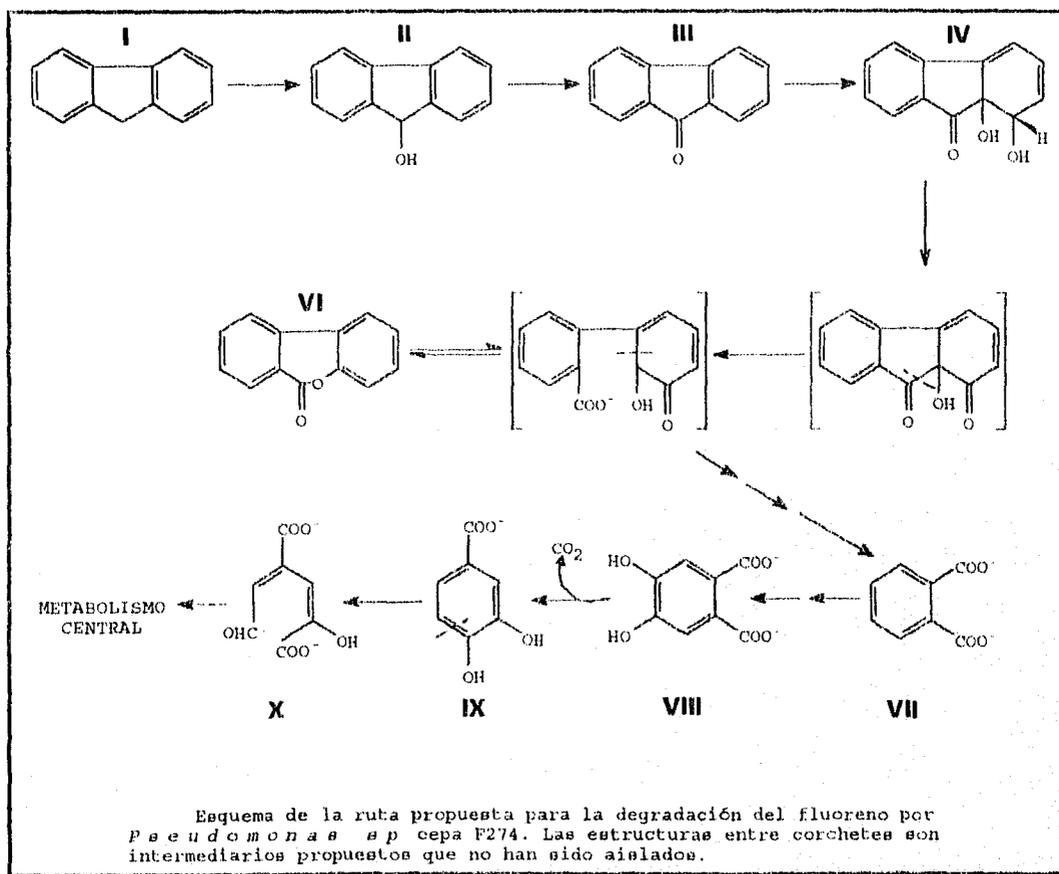
Pseudomonas sp cepa F274 tiene la capacidad de crecer en fluoreno como única fuente de carbono y de energía. Se propuso una nueva ruta metabólica para la degradación del fluoreno por *Pseudomonas* {Figura IV.59} que tiene las siguientes características sobresalientes diferentes a los mecanismos antes descritos:

- i) Monooxigenación al C-9 para dar 9-fluorenol (y subsecuentemente, 9-fluorenona).
- ii) Dioxigenación en un sitio angular en forma estereoespecífica.
- iii) Ruptura del anillo de cinco miembros para generar un bifenilo sustituido.

El primer paso del metabolismo del fluoreno (I) es la monohidroxilación en la posición 9 para generar 9-fluorenol (II), el cual es deshidrogenado a la cetona correspondiente, 9-

fluorenona (III) (previamente identificada como el producto de final en la degradación del fluoreno por *Arthrobacter sp*), la cetona es sustrato para la dioxigenación en un ataque angular, llevando a la formación de 1,1a-dihidroxi-1-hidro-9-fluorenona (IV). Ya que la dioxigenación produce un alcohol terciario, las características de la deshidrogenación no pueden conducir a la formación de 1,2-difenol, que generalmente es necesario antes de la apertura del anillo. Por consiguiente, la apertura del anillo parece ser resuelto por esta cepa mediante un nuevo mecanismo de ruptura del anillo de cinco miembros, llevando a la formación del 8-hidroxi-3,4-benzocumarina (en su forma metilada VI) lo que sugiere que el metabolismo del diol angular puede incluir una reacción biológica Baeyer-Villiger.

FIGURA IV.59



Otro tipo de reacción alternativa para la formación del 8-hidroxi-3,4-benzocumarina es la deshidrogenación del grupo 1-sec-alcohol del diol angular (IV) el cual puede producir un

tipo de compuesto 1,3 ó β -diceto el cual se hidroliza en el enlace C9-C10 produciendo al 2-carboxi-2',3'-dihidroxibifenilo.

La cumarina es de hecho una δ -lactona de este compuesto y puede ser formada como resultado de reacción de deshidratación reversible. La dioxigenasa cataliza la ruptura del 2-carboxi-2',3'-dihidroxibifenilo en el enlace C-1,2 y una subsecuente hidrólisis del producto con la apertura del anillo. Las reacciones análogas a la degradación de bifenilos aparecen para continuar con el metabolismo y dar lugar a la formación de biftalato (VII). El biftalato es dioxigenado en la posición 4 y 5 (VIII) antes de la descarboxilación para formar protocatecato (IX), el cual es entonces roto por la protocatecol 4,5-dioxigenasa, llevando a la formación del semialdehído 2-hidroxi-4-carboxi-cis, cis-mucónico (X) [59].

IV-10 COMPUESTOS METALICOS

Las perturbaciones de la autodepuración son debidas a la aportación directa de sustancias tóxicas que llevan principalmente las aguas residuales y los desperdicios de los centros industriales, debido a que matan a los organismos que participan en los procesos de remineralización. Se trata, sobre todo, de diversos compuestos de metales pesados y cianuros y venenos orgánicos.

El mercurio metálico y los iones mercurícos son menos tóxicos que los compuestos orgánicos de este metal, como los que se pueden originar, por ejemplo, por metilación bacteriana. Estos son liposolubles y por eso pueden tener acceso también al sistema nervioso humano. De ahí la importancia que tiene la actividad de las bacterias resistentes a los metales tóxicos para el hombre y demás organismos vivientes, así como el poder ser utilizadas para la recuperación de metales en la industria minera por la capacidad que poseen para transformar estos compuestos [119].

Los microorganismos pueden reducir enzimáticamente una variedad de metales en procesos metabólicos que no están relacionados con la asimilación de metales. Algunos microorganismos pueden conservar energía para soportar el crecimiento por acoplamiento de la oxidación de un ácido o alcohol simple, H_2 ó compuestos aromáticos para reducir Fe(III) o Mn (IV) [79].

Los metales que son potencialmente tóxicos (tales como arsénico, mercurio, cromo o uranio) a menudo pueden ser removidos de aguas contaminadas por reducción química [132].

IV-10.1 BIOTRANSFORMACION DE METALES Y COMPUESTOS METALICOS

Los microorganismos que utilizan metales como aceptores terminales de electrones, o reducen metales como un mecanismo de detoxificación, tienen una importante influencia en la geoquímica de sedimentos acuáticos, suelos sumergidos y superficies terrestres. Además, este proceso está comenzando a tener mayor importancia, ya que la reducción microbiana de

metales puede ser manipulada para incluirse en la remediación del medio ambiente y derrames de desechos contaminados con metales y ciertos compuestos aromáticos [79].

Por lo tanto, un tipo de biotransformación bacteriana que puede conducir a la destoxificación, y a una verdadera biorremediación, es la oxidación o reducción de metales pesados y de otros metales potencialmente tóxicos. No hay biodegradación (cambio en la estructura nuclear del elemento); sin embargo, el estado de oxidación del metal es alterada, así que el metal: (a) es más soluble en agua y es removido por lixiviación, o (b) es inherentemente menos tóxico, (c) es menos soluble en agua así que precipita y es menos biodisponible o es removido de la matriz, o (d) se volatiliza y es removido de la matriz contaminada [132].

Los metales que han sido más estudiados debido a su importancia ya sea por causar problemas ambientales o por que es importante su recuperación por la industria minera, se ha enfocado principalmente a 12 elementos que son:

- | | |
|--------------|-----------------------|
| 1) Cobre | 7) Oro y Plata |
| 2) Cromo | 8) Selenio |
| 3) Hierro | 9) Sulfuros metálicos |
| 4) Manganeso | 10) Tecnecio |
| 5) Mercurio | 11) Uranio |
| 6) Molibdeno | 12) Vanadio |

1) COBRE

Suspensiones celulares de *T. ferrooxidans* reducen el Cu(II) a Cu(I) en presencia de S^0 como un potente donador de electrones. El Cu(II) es reducido tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Sin embargo, solo una reducción neta ocurre bajo condiciones aerobias cuando la azida o el cianuro se adicionan para impedir la oxidación del Cu(I) por la hierro oxidasa. El sulfuro de hidrógeno:ión férrico oxidoreductasa que reduce Fe(III) y Mo(IV) (ver abajo) también reduce Cu(II). La reducción de Cu(II) por *T. ferrooxidans* puede jugar un papel importante en la lixiviación del cobre [79].

2) CROMO

En el mundo industrializado, el uso del cromo en el refinamiento de metales y en la electro galvanoplastia (capa niquelada o plateada) es extenso. Aunque las cantidades traza de Cr(III) son esenciales para la nutrición humana, el Cr(VI) (Cr^{6+} , CrO_4^{2-} y $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) es tóxico para plantas, animales y el hombre.

El uso de biomasa microbiana como un adsorbente de cromo, no ha sido usado frecuentemente, pero ofrece una alternativa barata. Ya que la especie iónica del Cr es dependiente del Eh y pH, puede ser posible controlar ambos parámetros químicamente a través del uso de bacterias reductoras de sulfatos (BRS) para asegurar la reducción y precipitación del Cr(VI), además de proveer la oportunidad de descontaminar los desechos líquidos y recuperar el cromo [54].

La reducción de la forma más tóxica y móvil de Cr(VI) a la forma menos tóxica y menos móvil de Cr(III) es un proceso que puede ser usado para la remediación de aguas y suelos contaminados por los procesos industriales que usan cromatos. Este problema ha estimulado el interés en los microorganismos que pueden utilizar al Cr(VI) como aceptor de electrones [79,132].

Las primeras investigaciones demostraron que algunos anaerobios facultativos tales como *Pseudomonas dechromaticans*, *Pseudomonas chromatophila* y *Aeromonas dechromatica* remueven Cr(VI) en solución por la formación de un precipitado de Cr(III), presumiblemente de $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Estudios subsecuentes han demostrado que la capacidad de reducción del Cr(VI) está ampliamente distribuida encontrándose en microorganismos tales como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter eurydice*, *Micrococcus roseus* y *Escherichia coli*, así como *Pseudomonas ambigua*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Streptomyces spp.*, *Pseudomonas putida*, *D. desulfuricans* y *D. vulgaris* [54,28,79].

La reducción del Cr(VI) es una reacción catalizada enzimáticamente en los reductores de Cr(VI), por ejemplo, en medios agotados de cultivos de *P. fluorescens* LB300 no hay reducción de Cr(VI), y en suspensiones de células lavadas si hay reducción de Cr(VI) solo si se proveen la glucosa y otros donadores de electrones disponibles. El cianuro (10^{-2} M) o la

azida (10^{-3} M) inhiben la reducción del Cr(VI) en extractos celulares crudos y la capacidad reductora del Cr(VI) se disminuye cuando la fracción membranal se elimina.

El Cr(VI) es rápidamente reducido a Cr(III) en sedimentos anaerobios acuáticos, pero los procesos no enzimáticos tales como reducción del Cr(VI) por Fe(II) son menos importantes que la reducción enzimática del Cr(VI).

La formación del precipitado de Cr(III) no es rápida y no puede ser eficientemente removida con centrifugación como se pensó para ser usado como un mecanismo de remoción del cromo de los sitios de contaminación. Una tecnología alternativa utiliza una cepa de *E. cloacae* que es colocada a uno de los lados de una membrana semipermeable y el medio que contiene Cr(VI) al otro lado. El Cr(VI) difunde al cultivo de *E. cloacae* para ser reducido a Cr(III), el cual es retenido del lado del cultivo, especialmente cuando se usa una membrana intercambiadora de iones que no permite el paso del Cr(III). La aplicación de esta tecnología a nivel de efluentes industriales ha sido problemática, debido a que los metales pesados y sulfatos presentes en los efluentes pueden inhibir la reducción del Cr(VI) [79].

Recientemente en China, se identificó un consorcio de SRB las cuales pueden encargarse de reducir grandes cantidades de cromo tóxico. El consorcio está inmovilizado y se identificó como SRBIII [54].

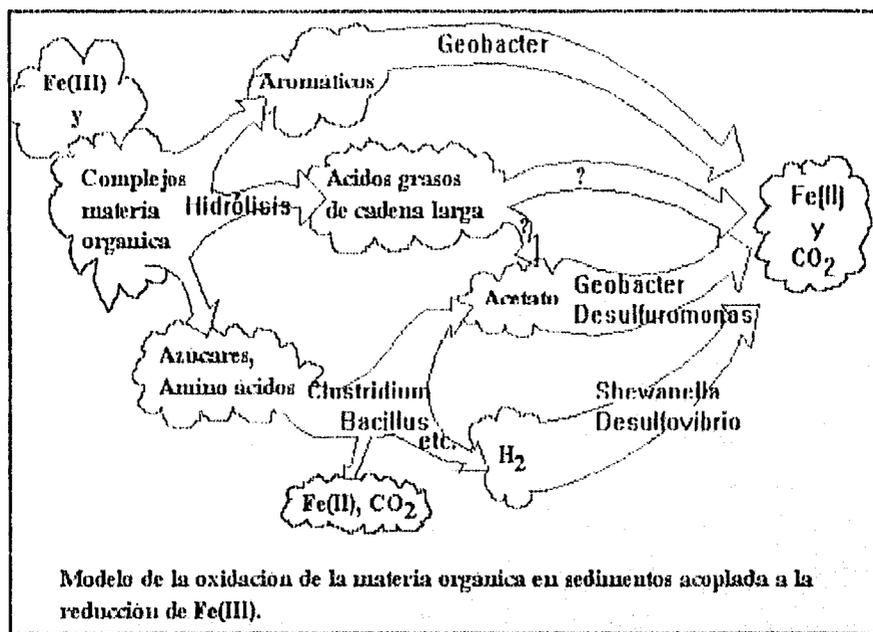
3) FIERRO

Se ha estudiado la reducción microbiana de Fe(III) a Fe(II) no sólo debido a su influencia geoquímica, sino también a que el Fe(III) es uno de los aceptores de electrones más abundantes y potenciales de la materia orgánica en descomposición en muchos sedimentos acuáticos y subsuelos ambientales. Hasta hace poco, se creía que la reducción del Fe(III) en sedimentos era el resultado de procesos no enzimáticos, sin embargo, ahora se sabe que en ambientes anaerobios, no sulfurigénicos en los cuales la reducción de Fe(III) es más importante, ésta es catalizada enzimáticamente.

En muchos ambientes sedimentarios tales como sedimentos acuáticos, suelos sumergidos y acuíferos, la oxidación de la materia orgánica acoplada a la reducción de Fe (III)

requiere la actividad cooperativa de diferentes tipos metabólicos de reducción no asimilatoria de Fe(III) {Figura IV.60}. Por ejemplo, se han descrito una gran variedad de microorganismos que pueden metabolizar azúcares o aminoácidos con la reducción de Fe(III).

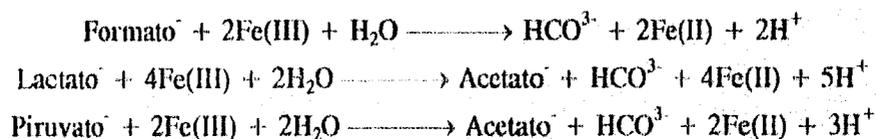
FIGURA IV.60



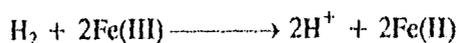
La especie de *Geobacter metallireducens* fue el primer microorganismo oxidante de acetatos conocido el cual conserva la energía y soporta el crecimiento por medio de la siguiente reacción:



La especie *Shewanella putrefaciens* puede también conservar la energía para mantener el crecimiento por medio de la acoplación oxidativa de compuestos orgánicos con la reducción de Fe(III):



Otros microorganismos que pueden acoplar la oxidación de H₂ con la reducción de Fe(III) son *Pseudomonas sp.*, *S. putrefaciens* y *Desulfovibrio spp.* por medio de la siguiente reacción [79]:



4) MANGANESO

La reducción microbiana de Mn(IV) a Mn(II) es paralela a la reducción no asimilatoria de Fe(III) y vice versa. Muchos microorganismos que reducen Fe(III) también reducen indirectamente Mn(IV) utilizándolo como un aceptor menor de electrones durante el metabolismo.

Se han investigado los sistemas de transporte de electrones al Mn(IV) en diversas especies de *Bacillus* que reducen Mn(IV). Sin embargo las evidencias sugieren que la reducción del Mn(IV) es una reacción lateral menor que no conserva la energía ni mantiene el crecimiento para estos microorganismos, de tal forma que este metabolismo tiene poca importancia para la reducción no asimilatoria de Mn(IV) en sedimentos.

El tipo-*c* de citocromo(s) en la especie *D. acetoxidans* son oxidados por Mn(IV), sugiriendo que están involucrados en el transporte de electrones al Mn(IV) [79].

5) MERCURIO

Las actividades humanas incrementaron la liberación del mercurio al aire, agua y biota entre 1900 y 1970, los cambios atmosféricos naturales liberaron 57mil toneladas, pero la industria minera liberó 361mil toneladas y los combustibles fósiles liberaron 151mil toneladas de mercurio.

El uso de compuestos organomercuriales como bactericidas y fungicidas en la industria de pinturas y en la agricultura, contribuye significativamente a la contaminación por mercurio

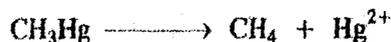
en el medio. El mercurio es un elemento importante en varios tipos de equipo de laboratorio, en fármacos, preparaciones dentales, como agente desinfectante y soluciones esterilizantes [109].

La reducción microbiana del Hg(II) puede jugar un papel importante en el rango de la concentración de mercurio en ambientes acuáticos y terrestres. Por ejemplo, se ha propuesto que la reducción microbiana de Hg(II) en las aguas de los océanos es una fuente importante de mercurio atmosférico [79].

Una especie bacteriana común en el medio es *Desulfovibrio desulfuricans* que puede metabolizar el mercurio, sin embargo lo convierte a una forma más peligrosa por la adición del grupo metilo llevando a la formación de metil mercurio. El metil mercurio es un compuesto tóxico recalcitrante que es bioacumulado y enriquecido en algunas cadenas alimenticias ya que en estanques o en pantanos se adhiere a pequeños organismos del plancton, los cuales son consumidos por peces los que a su vez son ingeridos por el hombre y el envenenamiento por pescado se ha atribuido a la ingestión de metil mercurio, siendo peligroso a los niveles basales de 10 a 100 ppm [109,139].

El metil mercurio es casi soluble en agua, pero forma coloides con materiales húmicos. Esto conduce a un incremento en la concentración de mercurio en la fase acuosa. Las sustancias húmicas transfieren el mercurio de suelos en equilibrio al agua y consecuentemente queda dentro de la cadena alimenticia [109].

Otro género bacteriano identificado como *Pseudomonas*, provee la solución a este problema. Para evitar la toxicidad del mercurio, estas bacterias convierten primeramente el metil mercurio a ión mercurio:



El ión mercurio cargado positivamente a la forma elemental relativamente inocua por adición de electrones lo que lleva a la formación de átomos de hidrógeno:



Estas bacterias actúan también lentamente en la naturaleza para la limpieza de derrames tóxicos hechos por el hombre [56]. Algunas cepas bacterianas pueden reducir el ión mercurio [Hg(II)] a la forma volátil de mercurio elemental [Hg(0)]. Se piensa que este proceso de reducción natural puede ser el responsable de la destoxificación ambiental de mercurio y está siendo desarrollado para futuras aplicaciones comerciales [132,79].

Sin embargo, el estudio de la reducción de Hg(II) en el medio ambiente es complicado por el hecho de que el ciclo del mercurio es mucho más complejo que los ciclos geoquímicos de otros metales redox como el hierro [79].

6) MOLIBDENO

La especie de *Pseudomonas guillermondii* y *Micrococcus sp.* reducen Mo(VI) a un compuesto azul [presumiblemente Mo(V)] durante el crecimiento en medio heterotrófico aerobio o en suspensión celular. El mecanismo de la reducción de Mo(VI) no ha sido determinado.

A altas temperaturas (60°C), bajo pH (<2) y con S⁰ como un donador potencial de electrones, *Sulfolobus brierleyi* y *S. acidocaldarius* reducen Mo(VI) a Mo(V) bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Las suspensiones celulares del mesófilo *T. ferrooxidans* también reducen Mo(VI) con S⁰. El grado de reducción del Mo(VI) es proporcional a la cantidad de proteínas celulares adicionadas y a las concentraciones iniciales de S⁰ y Mo(VI). La enzima sulfuro de hidrógeno:ión férrico oxidoreductasa purificada de *T. ferrooxidans* cataliza la oxidación de S⁰ a sulfito acoplada a la reducción de Mo(VI).

Aparentemente las investigaciones no ecológicas han examinado el papel de la reducción microbiana de Mo(VI). La reducción de Mo(VI) bajo condiciones ácidas pueden influenciar potencialmente el ciclo del molibdeno durante la lixiviación mineral. La reducción microbiana del Mo(VI) a pH cercanos a la neutralidad pueden estar involucrados en la concentración del molibdeno soluble en sedimentos marinos anaerobios y en rocas [79].

7) ORO Y PLATA

Las especies de *Bacillus subtilis*, *Apergilus niger*, *Chlorella vulgaris* y *Spirulina platensis* reducen Au(III) a Au(0). El Au(III) y El Au(I) se adsorben en las células de *C. vulgaris* con la subsecuente reducción a Au(0). La reducción de Au(III) a Au(II) es mucho más rápida que la reducción de Au(II) a Au(0) ocurriendo la primera reducción en minutos y la segunda en varios días. El mecanismo de la reducción del oro en estos organismos no ha sido bien aclarado.

De forma similar al Au(III) y el Au(I), la Ag(I) se adsorbe dentro de las paredes celulares de las bacterias y hongos con la subsecuente reducción de Ag(I) a la forma coloidal de Ag(0). La reducción de Ag(I) a Ag(0) a través de la producción de un compuesto reducido desconocido puede relacionarse con la resistencia a la plata de algunas bacterias.

La adición de Au(III) o Ag(I) resulta en la oxidación de un citocromo tipo-c en *G. metallireducens*, sugiriendo que el citocromo tipo c o una reductasa terminal puede transferir electrones al Au(III). Las suspensiones celulares de *D. vulgaris* reducen rápidamente Au(III) a Au(0), y el citocromo c_3 de *D. vulgaris* reduce Au(III) con la acumulación de Au(0).

La reducción microbiana de Au(III) puede conducir a la formación de depósitos de oro y puede ser usada potencialmente para remover el oro del agua y de derrames de desechos [79].

8) SELENIO

Aunque el selenio es clasificado como metaloide, es incluido debido al obvio paralelismo entre la reducción no asimilatoria de Se con la reducción no asimilatoria de metales. Se ha descubierto que a concentraciones tóxicas de Se fueron afectadas en forma adversa diversas poblaciones de pájaros en California.

Los estados redox predominantes del Se son selenato SeO_4^{2-} , Se(IV), selenito SeO_2^{2-} , Se(0) y selénido (-II), el primero de éstos sirve como aceptor de electrones en el metabolismo microbiano. Diversas especies de *Clostridium*, *Citrobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* pueden reducir selenato. Sin embargo, los mecanismos de reducción no han sido estudiados.

La cepa de *Pseudomonas sp.* AX, la cual fue aislada de un reactor usado para remover selenio, reduce el selenato a selenito:



La cepa SeS fue purificada de interfases de sedimentos de la bahía de San Francisco. La cepa SeS obtiene su energía para soportar el crecimiento por medio de la siguiente reacción:



La reducción de selenato y selenito en el medio ambiente, juega un papel central en el grado de destoxificación del Se en ambiente acuáticos y puede ser el principal mecanismo de remoción de Se de las aguas de desecho agrícola [79].

9) SULFUROS METÁLICOS

Los materiales que están contaminados con sulfuros metálicos pueden ser descontaminados vía reacciones de oxidación. Este proceso conocido como biolixiviación, es mediada por bacterias tales como *Thiobacillus ferrooxidans*, quien oxida el sulfuro metálico insoluble a sulfatos metálicos solubles en agua permitiendo la lixiviación para remover el compuesto metálico [132].

10) TECNESIO

El tecnecio tiene una larga vida (vida media de 2.15×10^5 años) los contaminantes radiactivos en el medio ambiente que son por productos de las reacciones de fisión ocurridas en las explosiones atómicas y en las estaciones nucleares. Bajo condiciones aerobias, el tecnecio está principalmente en la forma de pertechnetato [Tc(VII); TcO_4^-], el cual es altamente soluble. Diferentes estudios han demostrado que el desarrollo en condiciones reductoras de los suelos disminuye grandemente la solubilidad y movilización del tecnecio, presumiblemente como resultado de la reducción Tc (VII) a Tc(IV).

Uno de los pocos estudios que han examinado directamente el potencial de reducción de Tc(VII) por microorganismos, encontraron que un cultivo mixto de bacterias anaerobias producen la forma más insoluble y/o adsorbible del tecnecio a pertechnetato que los cultivos mixtos o puros de bacterias aerobias. El Tc(VII) es reducido durante el crecimiento en fase estacionaria de *Moraxella* y *Planococcus spp.* cuando el oxígeno disminuye en el medio

Las bacterias reductoras de sulfatos también pueden estar involucradas en la reducción del Tc(VII). Los microorganismos reductores de sulfatos, *Desulfovibrio gigans* y *D. vulgaris*, son más efectivos que los cultivos mixtos de microorganismos anaerobios en convertir al Tc(VII) a la forma insoluble. El molibdato es un inhibidor específico de los reductores de sulfatos, por lo tanto, inhibe la reducción de Tc(VII) en un cultivo mixto de microorganismos anaerobios marinos. Ambos estudios sugieren que la habilidad de los reductores de sulfatos para remover tecnecio en solución fue debida, en menor parte, a la formación de sulfuros insolubles de tecnecio y/o la liberación de otros agentes reductores [79].

11) URANIO

El uso extenso del uranio ha conducido a la contaminación de las superficies acuáticas, aguas freáticas, y vapores de desecho industrial, en respuesta, la US Geological Survey investigó la destoxificación enzimática del U(VI) soluble a la forma insoluble de U(IV). La forma reducida es insoluble en medio acuoso así disminuye su toxicidad al reducir su biodisponibilidad y permite el desarrollo de un proceso de separación mediada biológicamente [132].

La reducción microbiana de U(VI) a U(IV) es un proceso importante en el ciclo global del uranio y puede ser usado para técnicas de remoción de uranio de ambientes contaminados. *G. metallireducens* fue el primer organismo encontrado que usa U(VI) como aceptor de electrones:



S. putrefaciens también crece con U(VI) como el único aceptor y como el único donador de electrones:



Diferentes especies de *Desulfovibrio* pueden también reducir enzimáticamente U(VI) utilizándolo como único aceptor de electrones.

La precipitación reductiva de uranio de los mantos freáticos es considerado por ser el mecanismo para la formación de algunas areniscas. La literatura sugiere que la reducción es anaerobia. La reducción microbiana de uranio puede tomar el uranio que está disperso en grandes volúmenes de líquido y concentrarlos en un sólido muy puro y compacto ya que el U(IV) precipita como uranito (UO₂). Extracelularmente *D. desulfuricans* reduce U(VI) en un complejo U(IV)-carbonato así como también la especie de *G. metallireducens* [79].

12) VANADIO

Aunque la reducción microbiana del V(V) no ha sido extensamente estudiada, ésta capacidad metabólica entre los microorganismos puede estar muy extendida. Casi todas las bacterias heterótrofas y hongos aislados de un suelo pantanoso pueden reducir V(V). Sin embargo, el mecanismo de reducción no se ha reportado.

Dos microorganismos reductores de V(V) se estudiaron con más detalle. Se trata de *Pseudomonas vanadium reductans* que fue aislada de efluentes de fábricas metalúrgicas, y *Pseudomonas isachenkovii* que fue aislada del mar. La evidencia de la reducción de V(V) es primordialmente cualitativa. Durante el crecimiento anaerobio de estos microorganismos, el V(V) contenido en el medio, cambia el color de la solución de amarillo a azul, el cual es característico del V(IV). Con sucesivas incubaciones el medio se torna en negro y opaco, presumiblemente por la acumulación de partículas coloidales de V(III). Todo el V(V) fue reducido en cinco días de incubación. Diferentes azúcares, amino ácidos, lactato, glicerol, H₂ y CO₂ pueden servir como donadores para la reducción del V(V).

Este mecanismo de reducción del V(V) puede ser utilizado para eliminar vanadio de derrames de desechos en procesos minerales [79].

V.- LA INGENIERIA GENETICA Y LA BIORREMEDIACION

Durante los 70s y los 80s gracias al desarrollo de la biología molecular la aplicación práctica de los microorganismos expandió la imaginación con el descubrimiento de nuevas técnicas artificiales del DNA recombinante. Aunque la recombinación natural existe para unos pocos microorganismos, las nuevas técnicas biotecnológicas hacen posible la transferencia de genes entre especies completamente diferentes o no relacionadas. Sin embargo, gracias a la ingeniería genética un gen de un animal vertebrado, tales como el humano, puede ser insertado dentro del DNA de una bacteria o un gen de un virus dentro de una levadura. En muchos casos, el recipiente puede ser modificado para expresar el gen, el cual puede codificar para un producto de uso comercial. Por ejemplo, algunas bacterias pueden expresar genes para la insulina y de otras proteínas; la vacuna para la Hepatitis B es sintetizada por una levadura a la que se le ha introducido un gen que produce una proteína viral.

La manipulación genética es generalmente conocida como ingeniería genética. La ingeniería genética hace posible el empleo de diversas enzimas que pueden ser usadas para "cortar" al DNA de diferentes fuentes en segmentos específicos que son fácilmente recombinados in vitro. Ejemplos en donde se aplica el uso de la ingeniería genética son [139]:

- a) Inserción de genes de resistencia a plagas dentro de plantas.
- b) Modificación de las capacidades bioquímicas de bacterias para la limpieza de desechos.
- c) Copias de genes normales y anormales usados para el estudio de enfermedades genéticas.
- d) Producción de Insulina humana, interferón y otras sustancias de uso terapéutico en bacterias
- e) Producción de factores del crecimiento.
- f) Producción de proteínas usadas para procesos que se realizan a altas temperaturas.

La aplicación de las técnicas de biología molecular para la comprensión de las actividades microbianas en el medio ambiente ha entrado a un periodo de renacimiento. Las técnicas modernas de extracción de RNA y DNA acoplados al sondeo de genes, ha introducido el incremento en el uso de la ingeniería genética de organismos para la producción de diversos

productos, así como el lograr a través de esta tecnología incrementar la eficiencia de la biorremediación y los bioprocesos [106,10].

Esto ha hecho que se desafie a los microorganismos para desarrollar nuevas rutas al alterar su información genética preexistente, como resultado ya sea de mutación(es) en una simple estructura y/o la regulación de genes o tal vez por el reclutamiento de genes silenciosos cuando se encuentran frente al compuesto extraño [32].

Por ejemplo, existen asociaciones de microorganismos que pueden ser necesarios para degradar una molécula compleja (PCB, idem). Algunos organismos de la asociación pueden remover los átomos del halógeno sustituyente; otros pueden abrir el anillo aromático; una tercera especie puede ser necesaria para producir acetaldelído, lo cual puede llevar a la completa degradación de la molécula a CO₂ y H₂O por varias bacterias, pero usando las técnicas actuales de DNA recombinante, es posible reunir en una sola bacteria las habilidades metabólicas de todo el consorcio bacteriano [139].

El uso común de *T. ferrooxidans* y otras bacterias ácido-tolerantes en las operaciones de lixiviación mineral y su uso potencial en el tratamiento de desechos y desulfurización del carbón han generado interés en la manipulación genética de estos organismos. La clonación de genes de *T. ferrooxidans* en genes de *E. coli* ha permitido algunas caracterizaciones primarias de los plásmidos de resistencia a mercurio y arsenato [90].

Ciertas habilidades adquiridas por los microorganismos de trascendencia ambiental son transmitidas a través de plásmidos. Muchas de las características de los plásmidos bacterianos son importantes en medicina, agricultura y al medio ambiente. Tales características incluyen (1) propiedades de virulencia y resistencia a antibióticos, (2) la habilidad de fijación de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* en nódulos de raíces en legumbres, (3) producción de antibióticos por *Streptomyces*, y (4) el metabolismo de compuestos xenobióticos. Los plásmidos son raros en células eucariotes (excepto en levaduras) pero son muy comunes en bacterias. Son fragmentos de DNA y usualmente son innecesarios para la sobrevivencia de la bacteria hospedera, pero pueden habilitarla para matar a otra bacteria o proporcionarle genes de resistencia a antibióticos. Hay diferentes clases de plásmidos, los cuales pueden ser categorizados de acuerdo a su función.

Los plásmidos conjugativos pueden ser transmitidos de una bacteria a otra. Los plásmidos no conjugativos no pueden ser transmitidos por conjugación, pero pueden ser transferidos por transducción o por transformación.

Los plásmidos bacteriocitogénicos contienen un gen que dirige a la bacteria hospedera a la producción de bacteriocinas. Una bacteriocina es una proteína que destruye a otras bacterias pertenecientes a la misma especie o a especies muy relacionadas. Plásmidos de resistencia a antibióticos que en el caso de *Staphylococcus aureus* aislado de hospitales posee un gen que codifica para una β -lactamasa y por lo tanto no es sensible a la penicilina.

Los plásmidos que codifican para importantes enzimas degradativas son llamados plásmidos no asimilatorios o degradativos. Estos plásmidos son los responsables de la habilidad de ciertas especies de *Pseudomonas* para degradar solventes industriales recalcitrantes como el tolueno y xileno. Una combinación de diferentes plásmidos, cuando son transferidos a una especie de *Pseudomonas* permite a la bacteria desintegrar hidrocarburos complejos y otros compuestos presentes en el petróleo crudo [111].

Los plásmidos degradativos representan un grupo de plásmidos de presencia natural que codifican para enzimas capaces de desasimilar compuestos orgánicos complejos. Muchos de tales compuestos son tóxicos para los microorganismos pero la presencia y expresión de genes que llevan plásmidos degradativos permite a la célula hospedera reducir rápidamente la concentración tóxica de los sustratos. Los plásmidos degradativos pueden codificar para una ruta completa degradativa, como la ruta de degradación del xileno o tolueno (ver apartado IV-6.1), o sólo para reacciones parciales como en el metabolismo del salicilato o el naftaleno [37].

Sin embargo, se considera que todos los microorganismos a lo largo del tiempo podrían adquirir la habilidad para degradar todos los compuestos químicos nuevos introducidos en el medio ambiente a través de la tecnología. No obstante, aunque los microorganismos puedan adaptarse para remover muchas sustancias tóxicas, la gran variedad de los xenobióticos utilizados hoy en día pueden romper el balance del ecosistema [32].

V-1 MANIPULACION GENETICA PARA LA CONSTRUCCION DE CEPAS CON AMPLIO POTENCIAL DE BIODEGRADACION

Cuando los microorganismos se encuentran frente a un nuevo compuesto químico orgánico en el medio ambiente, pueden obtener de otros microorganismos los nuevos genes catabólicos necesarios para la degradación de estos compuestos a través de conjugación o eventos de transformación o pueden modificar sus propios genes por procesos de mutación. Por ejemplo, aunque hasta hace pocos décadas los compuestos orgánicos clorados se han liberado al medio ambiente, los microorganismos en la naturaleza aparentemente han desarrollado la habilidad para degradar algunos de los compuestos clorados. Los genes para la degradación de estos compuestos son a menudo plásmidos asociados. Los compuestos conocidos que pueden ser degradados por microorganismos naturales y los plásmidos responsables de tal degradación, se enlistan en la Tabla V.1.1 [37,32].

TABLA V.1.1

PLASMIDO	COMPUESTOS	PM	PLASM,	COMPUESTO	PM
pUU204	Acido 2-Monocloropropiónico	53 kb	pRC10	3CBA 2,4-D y MCPA	45 kb
pKF1	4-Clorobifenilo	82 kb	pEML159	2,4-D	?
*	4-Clorobifenilo	16, 72 kb	pJP1	2,4-D	58MDa
*	4-Clorobifenilo	50 Mda	pJP2	2,4-D	36MDa
pSS50	4-Clorobifenilo	53 kb	pJP3	2,4-D	52MDa
pAC21	1,4-Diclorobifenilo	65 Mda	*	PCP	80-100
*	1,4-DCB	?	*	3,-4-,5-Clorosalicilato	?
pJP4	3CBA	80 kb	*	2-,3-,4-cloroanilina	?
pJP4	2,4-D y MCPA	110 kb	*	2,4,5-T	?
pAC27	3CBA	105 kb	*	Clorotolueno	72MDa
pAC31	3,5DCBA	105 kb	*	Cloridazon	?
SAL	Salicilato	55 MDa	pU01	Fluoroacetato	44MDa
CAM	Aleanfor	150MDa	pU011	Fluoroacetato	40MDa
XYL	Xileno	10MDa	TOL	Xileno/Tolueno	75MDa
pAC31	3,5-DCB	72MDa	pAC25	3-Clorobenzoato	68MDa
pWW0	Tolueno	117MDa	NAH	Naftaleno	46MDa
XYL-K	Xileno/Tolueno	90MDa			

* No designados

Estudios recientes en la clonación y caracterización de genes degradativos podrían ayudar en el desarrollo de cepas bacterianas las cuales pueden atacar contaminantes recalcitrantes más agresivamente. Puesto que estos genes codifican para rutas catabólicas están a menudo altamente agrupados y asociados a otros genes, estos conjuntos de genes pueden ser clonados; si pueden ser rápidamente expresados en el nuevo hospedero, los microorganismos pueden desarrollar un rango más amplio de sustratos. Por ejemplo, transferir el plásmido bphABCD dentro de la bacteria degradadora de CBA, clorobenceno y 2,4-D puede adquirir la habilidad de degradar ahora también algunos PCBs. Alternativamente, la clonación de genes ha sido usada para expandir las habilidades microbianas degradativas.

Como un ejemplo en la tabla V.1.2 se presenta la habilidad de la ingeniería genética de la cepa *A. eutrophus* para metabolizar diferentes compuestos clorados [32].

TABLA V.1.2

ESPECIES	GENOTIPO	CRECE EN					
		TFD	PAA	4CB	CPH	SA	CSA
<i>Flavobacterium sp</i>	Hg ^r tfd ⁺ (pRC10)	+	+	-	+	-	-
<i>A. eutrophus</i>	Hg ^r tfd ⁺ (pJP4)	+	+	-	+	-	-
<i>A. eutrophus</i>	CURED	-	-	-	-	-	-
<i>A. eutrophus</i>	Hg ^r tfd ⁺ (pRC10)	+	+	-	+	-	-
<i>A. eutrophus</i>	Hg ^r tfd ⁺ (pRC301)	+	+	-	+	-	-
<i>A. eutrophus</i>	Hg ^r tfd ⁺ nahG	+	+	-	+	+	+
<i>A. eutrophus</i>	Hg ^r tfd ⁺ xylD	+	+	+	+	-	-

V-2 EFECTOS RESULTANTES DE LA LIBERACION DE MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

La función de la biología molecular aplicada a la ecología microbiana está generando una tecnología alternativa, así como también de nuevas incertidumbres. Estas incertidumbres están asociadas con (1) el uso ambiental de microorganismos modificados con Ingeniería Genética (GEMs) cepas capaces de expresar características que no están presentes en los microorganismos progenitores no modificados; (2) la probabilidad de la transferencia de estas características genéticas a otros microorganismos autóctonos en el medio ambiente; y (3) la posibilidad de que la nueva característica lleve un efecto deteriorante al medio ambiente.

El riesgo potencial a la salud pública y al medio ambiente de una liberación deliberada o accidental de GEMs dentro de un habitat, es de gran interés tanto científicamente como para la política pública. Preguntas sobre la probabilidad de sobrevivencia, colonización, y función del GEM liberado y de su nuevo DNA en habitats naturales y su habilidad para predecir las consecuencias de su liberación pueden ser contestadas solo por la aplicación del conocimiento derivado del estudio de las interacciones ecológicas y moleculares entre microorganismos en estos habitats.

Las características bióticas y abióticas pueden afectar la sobrevivencia, perpetuación, eficacia y riesgo asociado con la liberación del DNA de los GEMs para cualquier habitat natural. Sin embargo, la sobrevivencia de la nueva información genética y sus efectos potenciales en la homeostasis de un ecosistema puede ser más grande si la información es transferida a especies autóctonas que están más adaptadas al habitat específico que los GEMs introducidos.

Los procesos ecológicos mediados por los microorganismos que pueden ser evaluados antes de la liberación de un GEM en el medio podrían ser aquellos para los cuales las técnicas están bien establecidas, que cubren un amplio espectro de las actividades microbianas relevantes, y que han sido sucesivamente usadas para el estudio de las perturbaciones del suelo por factores químicos y físicos, por ejemplo:

- 1.- Actividad metabólica y mineralización del carbón, así como medición del CO₂ y otras técnicas de respiración.
- 2.- Transformación o fijación del nitrógeno por técnicas de perfusión.
- 3.- Fijación de N₂, usando la técnica de reducción de acetileno.
- 4.- Diversidad de la microbiota, usando medios selectivos y diferenciales.
- 5.- Actividad de enzimas seleccionadas, tales como arilsulfatasas (para proveer una medición del ciclo del azufre), fosfatasa alcalina y ácida (para el ciclo del fósforo), y deshidrogenasas (para proveer mediciones de otras actividades metabólicas).

Estos procesos pueden ser monitoreados por periodos largos después de la introducción de un GEM.

En adición a la evaluación de los efectos potenciales de GEMs en estos definidos procesos ecológicos, los investigadores pueden estar alertas para la posible aparición de efectos no anticipados que no pueden ser predecidos de la información codificada en el nuevo DNA (p. ejem. efectos pleiotróficos), como la adquisición de un plásmido que lleva genes para la fijación de N₂ y resistencia a antibióticos [134].

V-2.1 CONSECUENCIAS ECOLOGICAS DE LA LIBERACION DE MICROORGANISMOS

Se ha observado que muchos microorganismos liberados en el medio ambiente siguen un patrón para establecerse en él; tal patrón corresponde a la dispersión, sobrevivencia, además de la interacción (física o genética) con el medio ambiente [140].

Dispersión.- Se conocen tres rutas principales de dispersión que son el aire, el agua y los vectores.

- a) Aire.- Los microorganismos viables en el medio aéreo pueden ser transportados a grandes distancias y su sobrevivencia puede ser prolongada mediante su asociación con aerosoles o partículas sólidas.

- b) Agua.- Es difícil predecir el transporte acuático porque depende de complejos mecanismos físicos como son la adherencia a partículas.
- c) Vectores.- Los vectores son superficies sólidas en movimiento y pueden ser biológicos o físicos. Los microorganismos pueden ser dispersados por medio del tracto intestinal, glándulas salivales, linfa o en la superficie corporal de animales vertebrados e invertebrados. La dispersión física puede darse en la superficie o en espacios internos de objetos, vehículos o equipos hechos por el hombre.

La aplicación de vectores de campo (FAVs), los cuales son una combinación de un sustrato selectivo, un hospedero y un vector clonado han sido desarrollados para la propuesta de expresión de genes en ambientes no estériles, competitivos en los cuales los productos de los genes no proveen ventaja alguna al hospedero pero sirven para el catabolismo de ciertas sustancias recalcitrantes, por ejemplo, la degradación de los PCBs [31].

Sobrevivencia.- Para que el nuevo microorganismo liberado pueda sobrevivir necesita que no haya barreras ecológicas para que logre reproducirse, además de un gran número de condiciones ambientales, por ejemplo, temperatura, luz solar, humedad, nutrientes, interacciones biológicas y la competencia; por ejemplo, la producción de toxinas es una característica patógena que es un rasgo de sobrevivencia.

3.- Intercambio genético.- Una vez liberado, disperso y adaptado dentro del nuevo ambiente, ha sucedido que el microorganismo puede transferir sus características genéticas a otros miembros del ecosistema. El potencial de transferencia genética es muy grande y puede darse entre:

- a) Organismos de la misma especie. Como el plásmido de resistencia a antibióticos entre diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.
- b) También puede ocurrir entre miembros del mismo género. Como en el caso de *Pseudomonas sp cepa B13* y *Pseudomonas putida mt2*, el plásmido TLO fue transferido de *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas sp*.

c) Puede ocurrir entre diferentes géneros, como la transferencia de plásmidos de múltiple resistencia a fármacos entre *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* *in vitro*. Una ruta postulada de intercambio genético entre microorganismos puede verse en la figura V.1

d) Entre microorganismos y plantas. *Agrobacterium sp.* puede transferir algunos de sus plásmidos de DNA al dicotiledón de la planta.

e) Entre microorganismos y animales, y más significativamente entre microorganismos y el hombre. Tránsito del factor-R (gen) en el rumen de ovejas o entre *Escherichia coli* y el tracto gastrointestinal humano.

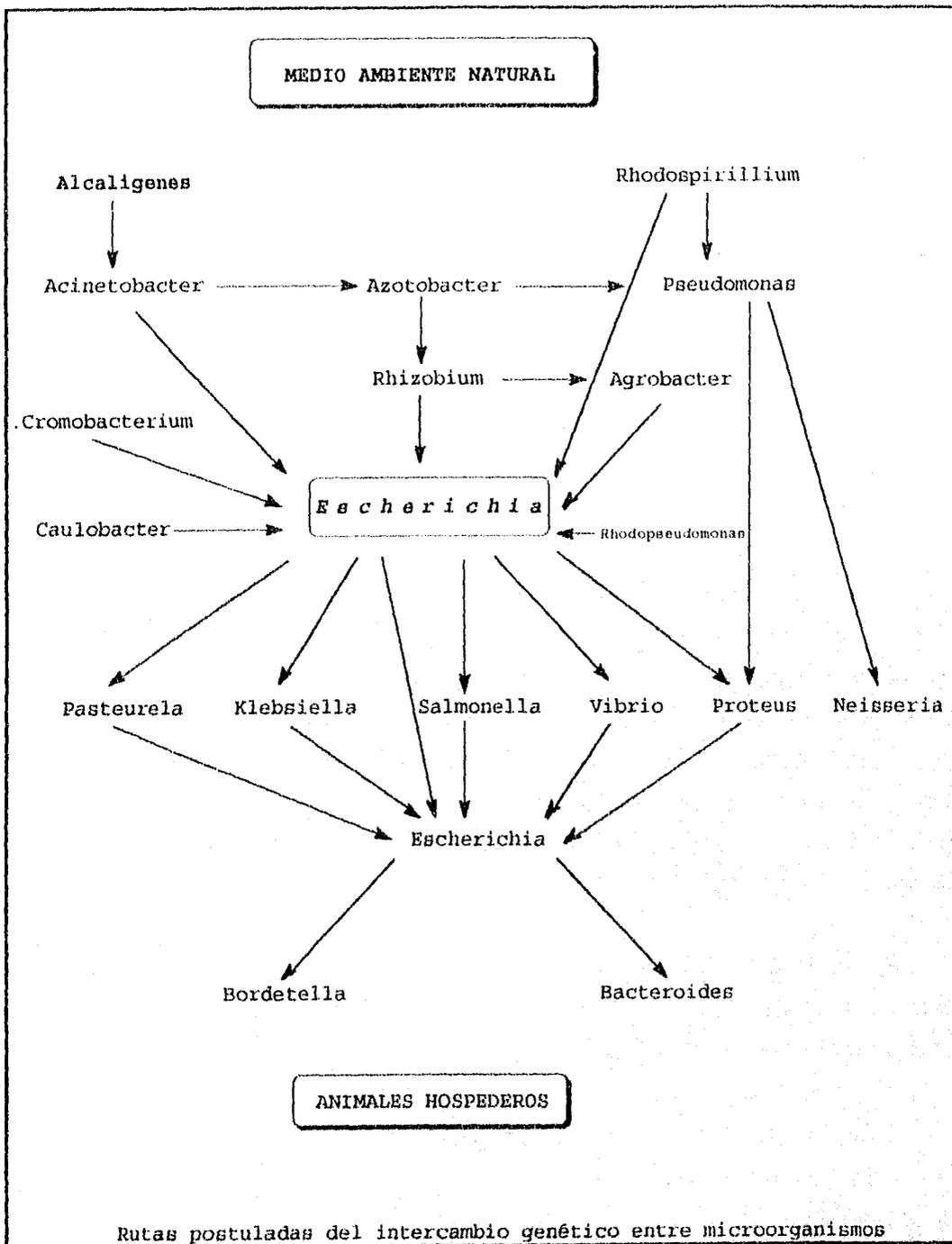
Muchos de los ejemplos anteriores han ocurrido bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, hay muchos ejemplos de transferencia genética en el ambiente natural, como el caso de la transferencia de plásmidos de múltiple resistencia a fármacos "RPI" de *Pseudomonas aeruginosa* a *E. coli*.

El principal efecto negativo del intercambio genético en el medio ambiente, es la transferencia de plásmidos de resistencia a antibióticos a especies patógenas para el hombre. Este problema es poco frecuente, pero se han presentado algunos casos como el sucedido en la India, al norte de Bengala en 1984, en donde 90,000 personas fueron seriamente afectadas y 3290 murieron a causa de una diarrea aguda. Esta epidemia fue esparcida por todo el estado del oeste de Bengala y 13 distritos de Orissa, Assam y Tripura. "The National Institute of Cholera and Enteric Diseases" en Calcuta, sugirió que la epidemia fue debida a una nueva cepa bacteriana virulenta resistente a antibióticos. La bacteria fue resistente a la ampicilina, tetraciclina y cloromicetina [140].

Se han aislado bacterias resistentes a antibióticos de diversos lugares como de aguas de desecho de hospitales, sedimentos costeros, estuarios y ríos, pesquerías, rastros de animales, plantas y suelos, y en agua potable [53].

Debido a todo lo anterior, se ha reglamentado el uso de microorganismos modificados genéticamente como un esfuerzo para evitar los daños en el medio ambiente y la salud que su empleo puede causar [153].

FIGURA V.1



CONCLUSION

El progreso tecnológico que el hombre ha logrado en los últimos años es impresionante, pero se ha equivocado al no advertir que mientras producía tantos bienes, alteraba en forma peligrosa los mecanismos originales que permiten el mantenimiento adecuado de la naturaleza.

Ante tal problema, los científicos han encaminado sus esfuerzos y conocimientos en tratar de corregir el daño que se ha provocado a la Biosfera y lograr restablecer nuevamente el equilibrio ecológico. Gran parte de estas investigaciones se han enfocado al uso de microorganismos debido a su potencial de degradación que cada vez es más sorprendente. Sin embargo, aún no se conocen suficientemente estas actividades fisiológicas de los microorganismos y en muchas ocasiones tampoco se tienen metas precisas para desarrollar soluciones biotecnológicas a problemas de destoxificación o limpieza.

Es necesario seguir estudiando a fondo las interacciones entre los contaminantes y los componentes del suelo y entre estos y los microorganismos para desarrollar tecnologías mejor dirigidas a la biorremediación específica, pues no siempre basta el microorganismo adecuado para tratar un compuesto, sino el estudio integral del comportamiento del microorganismo frente a ese compuesto, en un sitio concreto.

A través de la estimulación in situ de la microflora autóctona puede lograrse parte de este objetivo o a través de la ingeniería genética se pueden desarrollar cepas microbianas con amplias capacidades metabólicas dirigidas a degradar diversos contaminantes recalcitrantes. Aunque siempre se debe de tomar en cuenta el riesgo y responsabilidad que resulta por liberar un microorganismo modificado genéticamente en un ambiente natural, ya que en lugar de solucionar un problema, se estará creando uno aún mayor.

Es de esperar que concurran los conocimientos de las nuevas tecnologías y las decisiones de tratamiento de la contaminación para aplicar el gran potencial de los microorganismos en la biorremediación.

TABLAS DE INFORMACION DE MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN LA BIODEGRADACION DE CONTAMINANTES

GRUPO	MICROORGANISMO	PLASMIDO	COMPUESTO METABOLIZADO (SUSTRATO)	COMPUESTO FINAL DEL METABOLISMO	REFERENCIA
BACTERIAS	<i>Acetobacter wodii</i>	*	Ac. Gálico Hidroxibenzoato	* acetato + metano	90
	<i>Achromobacter sp.</i>	16 y 72 kb	4-Clorobifenilo	*	32
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	*	3-CBA	*	32
	<i>Acinetobacter sp.</i>	pKF1 pSS50 35kb pJP4 *	4-Clorobifenilo 2,4D, 2,4-dibromofenol y 2-metil-4-clorofenol. PBC DBT, hidrocarburos alifáticos, etiltiometon, isoxatión, antraceno	* Catecol 4,4'DCBF	90, 117, 32, 76, 1
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		DDT		34
	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	*	2,4-Diclorobenzoato, 4-CBA, 2,4-DCBA	*	32, 37
	<i>Alcaligenes sp.</i>	* pUU204 53kb pSS50 35kb * pEML159	1,3-Diclorobenceno, compuestos aromáticos. Ac. 2-monocloroacético. 4-Clorobifenilo. 1,3-DCB, 1,4-DCB, 4-clorofenol, 2-,3- y 4-cloro y 2,4-diclorofenol. 2,4-D.	* *	37, 32, 57, 119, 63, 117, 150

BACTERIAS

	*	Ac. úrico. 2-Br- 2-nitrofenol. Gasolina. PCB.		
<i>Alcaligenes xylooxidans</i>	*	Hidroxibenzoatos, benzoato	*	46, 117
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	* pJP4 pJPI-6 *	2,4-D, 4-Clorobifenilo. 3CBA. MCPA 2,4D. 2-Fluorobenzoato, 4-clorofenol, DDT	* Catecol	37, 32, 98
<i>Arthrobacter globiformis</i>	*	4-Clorobenzoato	*	117
<i>Arthrobacter sp.</i>	*	Ac. 4-clorobenzoico, 2,4D, monocloro, bromo-, iodoalcanos, 4CBA, PCP. Fluoreno. Nitrofenoles, 4-Clorobifenilo. 4-Cl, F- y Br-benzoato, DBT. clorobenzoatos	* 9-Fluorenona. NO ₂ , CO ₂ , catecol, HQ. Mineralización completa. 4-Hidroxibenzoato.	37, 32, 58, 90, 64, 76, 63, 117
<i>Azotobacter spp.</i>	*	Compuestos aromáticos	*	57
<i>Bacillus brevis</i>	*	5-Clorosalicilato, salicilato, 4- clorobifenilo	*	37, 32, 57
<i>Bacillus circulans</i>	*	Metolactor	*	37
<i>Bacillus megaterium</i>	*	Salicilato	*	57
<i>Bacillus sp.</i>	*	o.m,p-Bifalato. Almidón, agar. Grasas. Metolactor.	Benzoato. Glucosa. Ac. grasos + glicerina.	46, 119, 46, 37

BACTERIAS	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	*	Fenol, cresol, 4-hidroxifenilacetato	*	57
	<i>Bacillus subtilis</i>	*	DDT, Metaoxiclor	*	34
	<i>Brevibacterium sp.</i>	*	Fluoreno	*	58
	<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	*	4CBA, 2,4-DCBA, parafinas	*	32, 150
	<i>Caprococcus sp.</i>	*	Floroglucinol	Acetato	46
	<i>Chromobacterium</i>	*	Gasolina	*	150
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	*	Manitol	Ac. butírico	119
	<i>Clostridium pectinovorum</i>	*	Pectinas	Ac. pectínico + metanol	119
	<i>Clostridium sp.</i>	*	Almidón alfa-resorcilato Celulosa	Glucosa Acetato + metano	119, 5, 90
	<i>C. sp. + Campylobacter sp.</i>		Resorcinol	Acetato + butirato	
	<i>Clostridium tertium</i>	*	Hemicelulosa (xilanos)	H ₂ + CO ₂	119
	<i>Comamonas testosteroni</i>	*	Aroclor 1242	*	14
	<i>Cytophaga</i>	*	Celulosa	*	5
	<i>Desulfococcus</i>	*	Hidroxibenzoatos	*	46
	<i>Desulfonema</i>	*	Fenilacetato, hipurato	*	46
	<i>Desulfosarcina</i>	*	Fenol, indol	*	46
	<i>Desulfotomaculum sapotendens</i>	*	Ac. aromáticos, fenol	*	46
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	*	Petróleo	*	119
	<i>Desulfovibrio sp.</i>	*	Benzoato. Sulfato.	* Sulfuro	46, 90
	<i>Enterobacter cloacae</i>	*	Ferulato	fenilpropionato + fenilacetato	90
<i>Escherichia coli</i>	*	3,4-Hidroxifenilacetato	*	57	
<i>Eubacterium oxidoreducens</i>	*	Galato, pirogalol, floroglucinol	acetato, butirato y CO ₂	90	

BACTERIAS	<i>Eubacterium oxidoreducens</i>	*	Polifenoles, quercetin	*	46
	<i>Flavobacterium harrisonii</i>	*	Metaoxiclor	*	34
	<i>Flavobacterium sp.</i>	*	Pentaclorofenol, compuestos aromáticos, agar. 3CBA. PCP. MCPA, 2,4D. Bromoxinil. 2,4- y 3-nitrobenzoato. Hidrocarburos de cadena corta	* CH ₂ + CO ₂ CO ₂ + CN ⁻ + Br ⁻ 3-Hidroxibenzoato + nitrocatecol	37, 32, 57, 62, 117, 64, 119
	<i>Hyphomicrobium</i>	*	DNS	HCHO + HS + H ₂ O ₂	147
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	pAC21	1,4-Diclorobifenilo	*	32,34
	<i>Klebsiella pneumoniae azaenae</i>	*	Fensulfotion Bromoxinil	3,5-Dicromo-4-hidroxibenzoato	62
	<i>Methanospirillum</i>	*	Acidos grasos	CO ₂ + CH ₂	119
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	*	Metanol, acetato, metilamina, deri. del ác. gálico metoxilado.	CH ₂ y CO ₂	5,90
	<i>Methanosarcina sp.</i>	*	Percloroetano	*	32
	<i>Methylamonas</i>	*	Metano	*	5
	<i>Methylobacter</i>	*	Solventes clorados	*	76
	<i>Methylococcus sp.</i>	*	Solventes clorados	*	76
	<i>Micrococcus spp.</i>	*	4-Bromobenzoato, 4-clorobenzoato	4-Hidroxibenzoato	117
	<i>Moraxella sp.</i>	*	Protocatecato, ác. benzoico	*	46
	<i>Mycobacterium</i>	*	Gasolina, comp. aromáticos	*	150,76

BACTERIAS

<i>Paracoccus denitrificans</i>	*	Vanilato	*	46
<i>Pelobacter acidigallici</i>	*	Galato, pirogalol. Ac. siríngico.	**	46, 90
<i>Proteus vulgaris</i>	*	Urea, agar. Hidroxibenzoato.	Amoniaco y CO ₂ . Acetato + metano	119, 90
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	*	Cloroanilinas	*	21
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	pDBT2	DBT	*	90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*	4-Clorobifenilo. 3-Clorobenzoato.	Mineralización completa. 3-Clorocatecol	63, 117
<i>Pseudomonas cepacia</i>	* + *	2,4,5-T 2,6-Diclorotolueno. 2CBA, PCP, clorotolueno. Difeniléter.	* CO ₂	37, 32, 63
<i>Pseudomonas cruciviae</i>	*	5-Clorobifenilo, 4-cloro-4- hidroxibifenilo, PCB	*	32
<i>Pseudomonas erythra</i>	*	Hidrocarburos > 6C	*	5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	*	1,2-Dicloroetano, 1,2- dicloropropano, TCE, fenoles.	*	32,5
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	*	Dicamba	*	37
<i>Pseudomonas methanica</i>	*	Metano	CO ₂	5
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	*	Bifenilo, difenilmetano	*	63
<i>Pseudomonas PN-1</i>	*	Benzoato	*	46
<i>Pseudomonas putida</i>	* + pAC27 110kb pDBT2	3-Clorobenzoato, TCE. 1,4DCB. 3CBA. 3,4-Dicloroanilina, catecoles. Dibenzotiofeno.	*	39, 90, 37, 32, 76, 14, 117, 70, 150

BACTERIAS

<i>Pseudomonas stosteroni</i>	*	Acido benzoico	*	46
<i>Rhizobium</i>	*	DBT	*	90
<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i>	*	PCP	*	32
<i>Rhodopseudomonas gelatinosa</i>	/	m,p-Hidroxibenzoato, floroglucinol	*	46, 90
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	*	Benzoato	Acetil-CoA	46, 37
<i>Sarcina</i>	*	Gasolina	*	150
<i>Spirillum sp.</i>	*	Fenol, cresol	*	46
<i>Staphylococcus auriculans</i>	*	Fluoreno	1-, y 4-Hidroxifluorenona	57
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	*	1,2,4-TCB	Monoclorobifenilo	117
<i>Streptococcus</i>	*	Floroglucinol	Acetato	46
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	*	DNT	*	90
<i>Thiobacillus ferroxidans</i>	*	hierro ferroso, azufre	*	90
<i>Thiobacillus sp.</i>	*	DMS	CO ₂	147
<i>Thiobacillus thioparus</i>	*	DMS	HCHO + H ₂ S + H ₂ O ₂	147
<i>Vibrio</i>	*	Celulosa, ác. úrico, agar, quitina, grasas.	Ac. grasos, glicerina, N- acetilglucosamina	5, 119
<i>Xantobacter autotrophicus</i>	*	1,2-Dicloroetano	*	46
Consortio microbiano de bacterias fermentadoras + bacterias acetogénicas y metanogénicas.	*	Lignina, benzoato, tirosina, cinamato, fenilpropionato, fenilacetato, benzoato, fenol, catecol, hidroquinona, ferulato, vanilato, siringato, fenilalanina, triptofano, indol, coniferol, tolueno, clorobenceno, clorofenoles, clorobenzoato, clorofenoxiacetatos, nitrofenoles	*	46

METANOTROFOS	<i>Methosinus trichosporium</i>	*	Benceno, tolueno, etilbenceno, cresol, fenilacetatos	*	57
ACTINOMICETOS	<i>Esporas de Neurospora sitophila</i>	*	S-Triazina	*	34
	<i>Nocardia erythropolis</i>	*	2,4- y 3-Nitrobenzoato	3-Hidroxibenzoato y nitrocatecol	64
	<i>Nocardia opaca</i>	*	2,4- y 3-Nitrobenzoato	3-Hidroxibenzoato y nitrocatecol	64
	<i>Nocardia rubra</i>	*	Fenol, cresol, cianuro, formaldehído		
	<i>Nocardia spp.</i>	*	Ac. carboxílicos aromáticos, fenol, fenoles sustituidos, nitrobenceno, ác, úrico, clorobenzoatos. 4-Clorobenzoato. Ibuprofeno.	* 4-Hidroxibenzoatos	57, 64, 119, 75, 117, 33
	<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i>	*	PCP	2,6-Diclorohidroquinona	117
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	*	Aroclor. Estireno	* Acetaldehído + Piruvato	14, 148
	<i>Rhodococcus spp.</i>	*	Naftaleno, bifenilos	*	57
	<i>Streptomyces</i>	*	Acido úrico	*	119
HONGOS	<i>Aspergillus niger</i>	*	BPC. 2,4D	*	32
	<i>Aspergillus sp.</i>	*	Celulosa Gasolina	*	5, 150
	<i>Cunninghamella elegans</i>	*	Fluoreno	2-Hidroxifluorenona	57
	<i>Fusarium sp.</i>	*	Celulosa Metaloclor	*	5, 37
	<i>Monilia</i>	*	Gasolina	*	150

HONGOS	<i>Mucor sp.</i>	*	Metolactor, BAS	*	37, 2
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	*	Lignina	Productos insolubles + CO ₂	121
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	*	DDT, 2,4.5T, PCP, lignina, alquitrán, PAHs atrazina, TNT	* CO ₂ + NO ₂	67, 64, 32, 119, 142, 46, 94
	<i>Rhizopus japonicus</i>	*	Dieryl, BAS	*	2
	<i>Rhizopus nigricans</i>	*	BAS	*	2
	<i>Rhizopus peka</i>	*	BAS	*	2
	<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	*	Clorolignina	*	32
LEVADURAS	<i>Candida sp.</i>	*	Hidrocarburos alifáticos	*	76
	<i>Rhodotorula</i>	*	Manitol	D-Fructosa	119
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	*	Lindano	*	34
	<i>Torulopsis</i>	*	Manitol	D.Fructosa	119
	<i>Trichosporium cutaneum</i>	*	Fenol, protocatecato, homoprotocatecato, gentisato, 4-metilcatecol.	* Acetil CoA + Piruvato	39.57
ALGAS	<i>Anabaena flos-aquae</i>	*	Fenitrotion, fensulfotion	*	57
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	*	Metaoxiclor	*	34
	<i>Chlorella vulgaris</i>	*	Fenitrotion, fensulfotion	*	34
	<i>Cladophora sp.</i>	*	DDT	*	34
	<i>Closterium sp.</i>	*	Fensulfotion	*	34
	<i>Cuiroinghanella elegans</i>	*	Bifenilos (metabolismo parcial)	*	34
	<i>Nitzschia</i>	*	Fensulfotion	*	34
PROTOZOA- RIOS	<i>Euglena gracillis</i>	*	DDT	*	34

* No Reportado

+ Existe, pero no se ha reportado

GLOSARIO

ABIOTICO.- No vivo. Región o lugar donde la vida no es posible.

ACARICIDA.- Sustancia capaz de destruir o matar ácaros (garrapatas, piojos, pulgas).

ALGUICIDA.- Sustancia capaz de destruir algas.

ATRACTANTE.- Sustancia química usada en el control de insectos, aves y otros vertebrados.

AUTOTROFO.- Organismo capaz de utilizar CO₂ como única fuente de carbono.

AVICIDA.- Sustancia con la capacidad para matar aves.

BACTERICIDA.- Capaz de matar bacterias.

BIOACUMULACION.- Sinónimo de magnificación biológica.

BIOCONCENTRACION.- Habilidad de los microorganismos para almacenar materiales en el medio ambiente. El almacenaje puede ser dentro o fuera de las células.

BIOCONVERSION.- Producción biológica o enzimática de un producto útil, tales como metano, la degradación de los productos del petróleo como contaminantes y la destoxificación de plaguicidas organofosforados.

BIODEGRADACION.- Biotransformación que destruye el esqueleto de la estructura del compuesto padre, finalmente para producir productos hijos (metabolitos) de menor complejidad o mas bajo peso molecular.

BIOMASA.- Nombre aplicado a la masa de todos los seres vivos (cantidad total de materia viva) presente en una extensión determinada de corteza terrestre, masa acuosa, sistema cerrado, medio de cultivo, etc. Se da también este nombre a la masa viva que llena la totalidad de la Tierra.

BIORREACTOR.- Instalación destinada a la producción y reproducción de microorganismos (generalmente).

BIORREMEDIACION.- Uso intencional de los procesos de biodegradación para eliminar los contaminantes ambientales de los sitios donde ellos han sido derramados o descargados .

BIOSURFACTANTE.- Cualquier compuesto aprovechable y aislable obtenido de microorganismos que tiene alguna influencia sobre interfases. De este modo, es también usado como agente emulsificante y dispersante que no baja significativamente la tensión superficial del agua o exhibe otras propiedades clásicas de un surfactante.

BIOTA.- Conjunto de todos los seres vivos que tienen su hábitat en una región determinada.

BIOTECNOLOGIA.- Coombs en 1989 la definió como la aplicación de los organismos, sistemas o procesos biológicos en las industrias manufactureras y de servicios. En un sentido más estricto se define como el uso integrado de la Bioquímica, Microbiología e Ingeniería en orden para llevar a cabo la aplicación tecnológica (industrial) de las capacidades de los microorganismos, cultivo de tejidos, y células.

BIOTICO.- Perteneciente a la vida.

BIOTRANSFORMACION.- Conversión mediada biológicamente de un compuesto a otro sin alterar la fórmula química de éste. Generalmente lo que se cambia es el estado de oxidación del compuesto.

CICLO BIOGEOQUIMICO.- Sistema circular a través del cual algunos elementos son transferidos entre las partes bióticas y abióticas de la biosfera.

CO-METABOLISMO.- (Co-oxidación, metabolito análogo). Proceso por el cual un sustrato es modificado (a menudo por conversión estequiométrica) pero no es utilizado para el crecimiento, por un organismo que está metabolizando o creciendo en otro sustrato. Es un mecanismo muy importante para la degradación de herbicidas y plaguicidas.

COMPOSTEO.- Proceso de fabricación de una mezcla de abono de origen orgánico. Descomposición de materia orgánica heterogénea por poblaciones mixtas en un medio ambiente cálido y húmedo. Degradación microbiana incompleta de desechos orgánicos, donde los procesos microbianos pueden variar de aerobio a anaerobio.

DEPURACION.- Conjunto de operaciones que tiene por objeto purificar el agua utilizada para la bebida, uso doméstico e industrial. Se efectúa cuando se aprovechan aguas de superficies de ríos, lagos u otros sitios fácilmente expuestos a adquirir materias extrañas. La técnica de purificación depende de las impurezas que el agua contenga.

DEFOLIANTE.- Sustancia química usada para plantas indeseables que promueve la caída de las hojas de los árboles y plantas. Remueven las plantas vivas.

DESECANTE.- Compuestos químicos que aceleran la desecación de las plantas indeseables.

DETERGENTE.- Sustancia tensoactiva que tiene la propiedad, al disolverse en el agua, de limpiar y eliminar las pequeñas partículas de grasa o polvo adheridas a la superficie y que constituyen la suciedad. Actúa como agente humectante y emulsionante y reduce la tensión interfacial entre la grasa y el agua, facilitando así la eliminación de aquella.

ENSILAJE.- Método de conservación de forrajes verdes, tubérculos, raíces y residuos industriales, destinados a la alimentación del ganado y que se disponen en masas comprimidas, fuera del contacto del aire para favorecer su fermentación y conservación.

ESTABILIZACION.- Dar o propiciar una situación de equilibrio.

ESTERILIZANTE.- Sustancia química con la propiedad de esterilizar lo que antes no lo era. Es usado para el control de insectos y ciertos vertebrados.

EUTROFICACION.- Enriquecimiento nutritivo de aguas naturales, comunmente por causas artificiales y que con frecuencia produce un crecimiento excesivo de algas.

FUNGICIDA.- Sustancia química que destruye cualquier clase de hongos.

FREATICO(A).- Aguas acumuladas en el subsuelo sobre una capa impermeable y que pueden aprovecharse por medio de pozos. Capa del subsuelo que contiene estas aguas.

GENOTOXICO.- O Xenotóxico. Sustancia tóxica producida por el hombre

HERBICIDA.- Sustancia química empleada para controlar el crecimiento de plantas indeseables como pastos o malezas.

HETEROTROFO.- Organismo que obtiene el carbono a partir de compuestos orgánicos.

HUMIFICACION.- Proceso de putrefacción o descomposición microbiana de la materia orgánica (especialmente de naturaleza vegetal) que conduce a la formación de humus. En suelos secos y fríos la humificación es muy lenta; las condiciones más favorables las reúnen los suelos húmedos de las zonas cálidas y templadas.

HUMUS.- Materia orgánica del suelo parcialmente descompuesta.

INSECTICIDA.- Grupo de productos empleados para matar insectos por medio de una acción química.

LIXIVIACION.- Operación consistente en separar sustancias solubles de otras insolubles. Empleo de bacterias para extraer metales de valor comercial a partir de minerales.

LLUVIA ACIDA.-Lluvia con bajo pH debida a la presencia de ácido sulfúrico o ácido nítrico; en forma más general se refiere a cualquier deposición atmosférica acidificada.

MAGNIFICACION BIOLÓGICA.- Incremento en la concentración de algunos materiales en los organismos comparada con su concentración en el medio ambiente.

MINERALIZACION.- Transformación de compuestos orgánicos en inorgánicos, con lo cual se disminuye la complejidad biogeoquímica y se facilita su utilización por los microorganismos.

MOLUSCIDA.- Sustancia química que mata moluscos (caracoles).

NEMATICIDA.- Producto químico con la capacidad para destruir nemátodos.

OLIGOTROFICO.- Descripción de una concentración en agua en la que los nutrientes se encuentran en baja concentración.

PATOGENICIDAD.- Potencial de la habilidad de los organismos vivos y virus para infectar al hombre ó a otra forma más alta de vida y causar enfermedades.

PISCICIDA.- Sustancia química que mata peces.

PLAGUICIDA.- Incluye a los productos químicos que estimulan o retardan el crecimiento de plantas, conocidos como reguladores del crecimiento, estos incluyen desecantes y defoliantes; este término también se aplica a los compuestos usados para repeler, atraer y esterilizar insectos.

PLASMIDO.- Elemento genético autónomo que replica independientemente del cromosoma y codifica para un rango amplio de funciones en muchas bacterias.

QUIMIOAUTOTROFO.- Organismo autótrofo que obtiene energía de la oxidación de compuestos inorgánicos. Obtiene su fuente de carbono a partir de la fijación del CO₂.

QUIMIOLITOTROFO.- Organismo que utiliza un compuesto inorgánico como fuente de energía utilizando dichos compuestos inorgánicos como donadores de electrones.

RECALCITRANTE.- (Persistente). Habilidad de una sustancia para permanecer en un medio ambiente particular en una forma incambiable.

REPELENTE.- Sustancia de naturaleza química que rechaza o repele a ciertos organismos vivos (generalmente insectos, aves y otros vertebrados).

RESIDUO.- Cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permite usarlo nuevamente en el proceso que los generó.

RODENTICIDA.- Se aplica a las sustancias químicas que puede matar cualquier tipo de roedor.

SILVICIDA.- Sustancia química que destruye árboles y arbustos.

XENOBIÓTICO.- Compuesto hecho por el hombre (antropogénicos) que poseen estructuras químicas hacia las cuales los microorganismos no han sido expuestos en el curso de la evolución. También abarca a aquellos compuestos que están presentes en forma natural en el medio ambiente, pero que las actividades humanas incrementa su concentración normal" a niveles que causan efectos indeseables.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Adriaens, P.; "Continuous coculture degradation of selected polychlorinated biphenyl congeners by *Acinetobacter spp.* in aerobic reactor system", *Environ. Science. Technol.*, 1990, 24(7):1042-1049.
- 2.-Aizawa, Hiroyasu; "Metabolic Maps of Pesticides", Academic Press, Orlando, 1982, 238 pp.
- 3.-APHA, AWWA, WPCF; "Standard methods for the examination of water and wastewater", 16 ed., EEUU, 1985.
- 4.-Atlas, R.M.; *Chemical and Engineering News*, 1995, 73(14):32-42.
- 5.-Atlas, Ronald M.; Richard Bartha, "Microbial ecology fundamentals and applications", 2a ed., The benjaming/Cummings Publishing Company, California, 1987.
- 6.-Baskt, J.S.; "Impact of present and future regulations on bioremediation", *J. Ind. Microbiol.*, 1992, 8(1):13-22.
- 7.-Best, D.J.; (et al), "The environment and biotechnology", Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1985.
- 8.-Betz Handbook of Industrial Water conditioning, 5a ed., Betz Laboratories Ing., Pennsylvania, 1957.
- 9.-Bogan, R.H.; C.N. Sawyer; "Biochemical degradation os synthetic detertents", *Sewage and Industrial Wastes*, 1956, 28(5):637-648.
- 10.-Bogosian, Gregg; James F. Kane; "Fate of Recombinant *Escherichia coli* k-12 strains in the environment , *Adv. Appl. Microl.*, 1991, 36:87-92.
- 11.-Bohmont, Bert L; "The Standar pesticide user 's guide", Prentice Hall, New Jersey, 1990.
- 12.-Bomio, Michele; (et al); "Growth and biocatalytic activities of aerobic thermophilic population in sewage sludge", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989, 32:356-362.
- 13.-Boyde, Thomas; Carlucci, A.F.; "Use of a 3H-labeled substrate to measure microbial biodegradation in marine waters ", *J. Microbiol. Methods*; 1994, 20(1):11-22.
- 14.-Boyle, A.W., (et al); "Bacterial PCB biodegradation", *Biodegradation*, 1992, 3(2-3):285-98.
- 15.-Bradley, P.M.; (et al), "Microbial transformation of nitroaromatics in surface soils", *Appl. Environ. Microbiol.*, June, 1994, 60(6):2170-2175.
- 16.-Bretthauer, E.W.; "New Davids to tackle environmental Goliaths", *EPA-J.*, 1992, 18(2):50-52.
- 17.-Brock, D. Thomas, "Microbiología", 4a ed., Prentice-Hall, 1987.

- 18.-Brockman, F.J.; Ornstein R.L.; "Enhanced bioremediation of subsurface contamination: Enzyme recruitment and redesign", Department of Energy, Washington, D.C., Govt. Reports. Announcements & Index, 1992, 15.
- 19.-Brubaker, Gaylen R.; Jurgen H. Exner; "Bioremediation of chemical spills", en Omenn, Gilbert S., "Environmental Biotechnology", Plenum Press, New York, 1988, p 163-171.
- 20.-Brunner, C.R.; "Handbook of incineration system", McGraw-Hill, Nueva York, 1991.
- 21.-Brunsbach, R. Franz; Walter Reinek; "Degradation of chloroanilines in soil slurry by specialized organism", Appl. Microbiol. Biotechnol., 1993, 40:402-407.
- 22.-Bryant, S.E.; Schultz T.W.; "Toxicological assessment of biotransformation products of pentachlorophenol: *Tetrahymena* population growth impairment ", Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1994, 26:299-303.
- 23.-Bumpus, J.A. (et al); "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* ", Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 55:154-158.
- 24.-Capone, D.G.; J.E. Bauer; "Microbial processes in coastal pollution", en Mitchell, Ralph, "Environmental Microbiology", John Wiley-Liss, John Wiley & Sons. Inc. Publication, New York, 1992.
- 25.-Catallo, W.J.; (et al), "Use of indigenous and adapted microbial assemblages in the removal organic chemicals from soils and sediment", Water Sci. Technol., 1992, 25:3.
- 26.-Cerniglia, C.E, "Microbial metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon" Adv. Appl. Microbiol., 1984, 30:31-71.
- 27.-Cerniglia, C.E.; (et al); "Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans* ", Apl. Environ. Microbiol., 1989, 55:2275-2279.
- 28.-Cervantes, C., "Bacterial interactions with chromate", J. Microbiol. Serol., 1991, 59:229-233.
- 29.-CFE-Suterm; "Instructivo para el manejo de los BPCs (Bifenilos policlorados, PCBs, o Askarales) ", Comisión Nacional de Higiene, México, 1982.
- 30.-Chapman, Peter J.; "Constructing microbial strain for degradation of halogenated aromatic hydrocarbons", Environmental Biotechnology, Plenum Press, New York, 1988.
- 31.-Chavez, García Hugo; Raúl Quijano Hernández, "Residuos peligrosos: Manejo y tratamiento de bifenilos policlorados (BPCs)", TESIS, Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 1985.
- 32.-Chaundry, G. Rasul, S. Chapalamadugu; "Biodegradation of Halogenated Organic Compounds", Microbiological Reviews, Mar., 1991, p. 59-79.
- 33.-Chen, Yijun; John P.N. Rosazza, "Microbial transformation of ibuprofeno by *Nocardia* species", Appl. Environ. Microbiol., Apr, 1994, 60(4):1292-1296.

- 34.-Cheng, H.H., "Pesticides in the soil environment: Processes impacts, and modeling", No 2, Soil Science Society of America, Inc., Madison-Wisconsin, USA, 1990.
- 35.-Composting from waste to resource, Washington Suburban Sanitary Commission, 1990.
- 36.-CONADE, "Informe de la situación en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1989-1990 ", México, 1991.
- 37.-Cork, Douglas J., James P. Krueger, "Microbial transformation of herbicides and pesticides"; *Adv. Appl. Microbiol.*, 1991, 36:1-65.
- 38.-Crawford, J.H., "Composting of agricultural wastes. A review", *Process Biochemistry*, Jan/Feb, 1983, p 14.
- 39.-Dagley, Stanley., "Lesson from Biodegradation"; *Ann. Rev. Microbiol*, 1987, 47:1-23.
- 40.-Darwin, Charles, "El origen de las especies", Diana, México, 1983.
- 41.-Diccionario Enciclopédico Salvat; Salvat Editores, Barcelona, 1976.
- 42.-Diario Oficial. "Relacion de registros de plaguicidas". Martes 11 de Agosto de 1992. p. 10-16.
- 43.-Dirkzwager, A.H.; P.L'Hermitte, "Sewage sludge treatment an use: new development, technological aspects and environmental effects", Elsevier Applied Science, London, 1989, p. 422-426.
- 44.-Espinoza, Valdemar Rosa María, Algunos aspectos de la biología de los lodos activados y su relación con la degradación de detergentes", Tesis, UNAM, ENEP Iztacala, 1984.
- 45.-Evans, Patrick J.;(et al), "Metabolites formed during anaerobic Transformation of Toluene and o-Xilene and their proposed relationship in the initial steps of toluene mineralization"; *Appl. Environ. Microbiol.* Feb., 1992, 58(2):496-501.
- 46.-Evans, W. Charles. "Anaerobic degradation of aromatic compounds", *Ann. Rev. Microbiol.*, 1988, 42:289-317.
- 47.-Falkow, Stanley, "Using knowledge of virulence factors to select or desing organism with low risk of pathogenicity" en Omenn, Gilbert S., "Environmental Biotechnology", Plenum Press, New York, 1988, p 121-126.
- 48.-Fava, F., "Biodegradation of chlorinated biphenyls (Fenclor 42) in batch cultures with mixed and pure aerobic cultures", *Chemosphere*, 1991, 22(1-2):3-14.
- 49.-Fewson, Charles A., "Biodegradation of Xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance". *TIBTECH*, July, 1988, 6:148-53.
- 50.-Fiorenza, S., "Decision making- Is bioremediation a viable option?". *J. Hazardous Mater.*, 1991, 28(1-2):171-83.
- 51.-Foght, J.M.; Westlake D.W.S., "Bioremediation of oil spills", *Spill. Technol. Newslett.*, 1992, 17(3):1-10.

- 52.-Fox, J.L., "Native microbe's role in Alaskan clean-up", *Bio/Technology*, 1989, 7:852.
- 53.-Frommer, W., (et al), "Safety precautions for handling microorganisms of different risk classes", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989, 30:541-552.
- 54.-Fude, Li; (et al), "Reduction of Cr(VI) by consortium of sulfate-reducing bacteria (SRBIII) ", *Appl. Environ. Microbiol.*, May, 1994, 60(5):1525-1531.
- 55.-Goldstein, Nora; David Riggle, "Healthy future for sludge composting", *Biocycle, Protection Survey*, Dec., 1989, p. 28-34.
- 56.-Goodman, Louis S.; Alfred Gilman, "Las bases farmacológicas de la terapéutica", 8a ed., Médica Panamericana, México, 1991.
- 57.-Gray, N.F.; "Biology of wastewater Treatment ", Oxford University Press, Oxford , 1992
- 58.-Gray, R Morray; (et al), "Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactor", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, 40:933-940.
- 59.-Grifoll, M.; (et al), "Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas sp.* strain F274", *Appl. Environ. Microbiol.* Jul., 1994, 60(7):2438-2449.
- 60.-Harvey, s.,(et al). "Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaska gravel by a microbial surfactant", *Bio/Technology*, March, 1990, (8)228-230.
- 61.-Hashizume, K.; (et al), "Degradability of chemicals by microorganism in pond water " , *Japanese Journal of toxicology and environmental Health*, 1994, 40(1):79-80.
- 62.-Hicks, R.J., (et al), "Review and evaluation of the effects of xenobiotic chemicals on microorganisms in soil"; *Adv. Appl. Microbiol.*, 1990, 35:195-251.
- 63.-Higson, Frank K., "Microbial degradation of biphenyl and its derivatives", *Adv. Appl. Microbiol.*, 1992, 37:135-64
- 64.-Higson, Frank K., "Microbial Degradation of Nitroaromatic compounds", *Advances in Applied Microbiology*, 1992, 37:1-19.
- 65.-Hideak, Naoto Masuda; (et al), "Degradation of alkylphenol by *Pseudomonas sp.* strain TR01", *Appl. Environ. Microbiol.*, July, 1994, 60(7):2265-2271.
- 66.-Houten, Joseph Van; Diane O. Fleming "Comparative analysis of current US and EC biosafety regulations and their impact on the industry", *J. Ind. Microbiol.*, 1993, 11:209-215.
- 67.-Illman, Deborah L., "Hazardous waste treatment using fungus enters marketplace"; *Science/Technology*, July 12, 1993 C&EN , Washington, p. 26-29.
- 68.-Jorgenson, M.F.; (et al), "Cleanup and bioremediation of a crude-oil spill at Prudhoe Bay, Alaska", *Environment Canada, Ottawa, on (Canada). Technology Development. 15e Colloque technique du programme de lutte contre les versements d'hydrocarbures en mer et dans l'artique (AMOP) 1992, p723-738.*

- 69.-Kaplan, D.L.; Kaplan A. M., "Termophilic biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene under simulated composting conditions", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 44:757-760
- 70.-Kertesz, Michael A.; (et al), "Desulfonation of linear alkylbenzensulfonate surfactante and related compounds by bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60(7):2296-2303.
- 71.-Kosaric, Naim, "Biosurfactants", Vol 48, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
- 72.-Küenzi, M.,(et al), "Safe biotechnology general considerations". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1985, 21:1-6.
- 73.-Kuhn, E.P.; (et al) "Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, 54:490-496.
- 74.-Kuropka, D. "Análisis de PCBs y HAP", Programa sobre el manejo de residuos peligrosos organizado por la dirección Central TUV Rheyland, Alemania, 1993, Mayo, 10-25.
- 75.-Lajoie, C.A.:(et al),"Development of field application vectors for bioremediation of soils contaminated with polychlorinated biphenyls", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59(6):1735-41.
- 76.-Leahy, Maureen C.; Richard A. Brown, "Modelling mapping are critical, whilw air sparging and soil vapor extraction have become strong allies", *Chem. Engineer.*, May, 1994, p 108-116
- 77.-Lehninger, Albert L., "Principles of biochemistry", 2a ed., Worth Publishers, EEUU, 1993.
- 78.-Ley general del equilibrio ecológico y la protección al ambiente ", Porrúa, México, 1993.
- 79.-Lovley, Derek R., "Dissimilatory metal reduction", *Ann. Rev. Microbiol.*, 1993, 47:263-290.
80. Lovly, D.R.; D.J. Lonergan, "Anaerobic oxidation of toluene, phenol and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15"; *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56:1858-1864.
- 81.-MacCarty, P.L., "Engineering concepts for in situ bioremediation", *J. Hazardous Mater.*, 1991, 28(1-2):1-11.
- 82.-MacKinney, R.E.; J.M. Symons., "Bacterial Degradation of ABS", *Sewage and Industrial Wastes*, 1959, 31:549-556.
- 83.-Mackenzie, L. Davis; David A. Corwell, "Introduction to environmental engineering", 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1994.
- 84.-Madse, Eugene L., "Bioremediation of Environmental pollutants", *Cornell Engineering*, Summer, 1992, 26(4):7-11.
- 85.-Mandelbaum, R.T.; (et al), "Biodegradation of the herbicide Atrazine by *Pseudomonas sp.ADP*", 94th ASM General Meeting, Q-86, p 401.
- 86.-Martin, Alexander; "Introducción a la microbiología del suelo", AGT, Editor, 1980.
- 87.-Merlin, F.X.; (et al), "Elaboration of an experimental method to assess biodegradation agents: Bioremediation trials on oil-polluted bacin", *Envoroment Canada*, Ottawa, 15e Colloque

- technique du programme de lutte contre les déversements d'hydrocarbures en mer et dans l'Arctique (AMOP), 1992, p723-738.
- 88.-Metry, Amir, "Handbook of hazardous waste management", Pergamon Press, New York, 1984
- 89.-Molina, López Manuel, "Biorremediación de suelos", Tecnología ambiental, 1994, II(1):5-8.
- 90.-Monticello, D.J.; Finnerty, W.R., "Microbial Desulfurization of Fossil Fuels"; Ann. Rev. Microbiol., 1985, 39:371-389.
- 91.-Morgan, P. S.; (et al), "Comparison of abilities of white rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds". Appl. Microbiol. Biotechnol., 1991, 34:693-696.
- 92.-Morrison Kudson Corporation, "Plan de muestreo y análisis", Waste characterization task field sampling training course, Denver Colorado, April, 1993.
- 93.-Morrison, Robert Thornton; Robert Neilson Boyd, "Química Orgánica", 2aed., Ad dis- Wesley Iberoamericana, Argentina, 1985.
- 94.-Mougin, Christian; (et al), "Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environ. Microbiol., Feb, 1994, 60(2):705-708.
- 95.-Muir, D.C.; D.F. Kenny, "Fate and acute toxicity of bromoxinil esters in an experimental prairie wetland", Environmental Toxicology Chemistry, 1991, 10:395-406.
- 96.-Mulbry, W.W.; Karns J.J., "Bioremediation of contaminated sites to protect water quality" U.S. Department of agriculture/agricultural research service. Beltsville, Maryland. Fedrip-database,-National Technical Information- Service (NTIS), 1994.
- 97.-Müller-Hurting, R.; (et al), "Biosurfactants for environmental control", en: Kosarik, Naim; "Biosurfactant. Production Properties Applications", Marcel Dekker, Inc., New York, 1993.
- 98.-Nadeau, Lloyd J.; (et al), "Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5", Appl. Environ. Microbiol., Jan, 1994, 60(1):51-55.
- 99.-Nastasa, V.; (et al), "The presence of detergents in surface water sources and their health and ecological implications", Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat-Iasi., 1993, 97(1):481-484.
- 100.-Nelson, Christopher H. "A natural cleanup", Civil Engineering, March, 1993, p 57-59.
- 101.-Nelson, J.F.; (et al), "The biodegradability of alkylbenzen sulfonates", Development in Industrial Microbiology, 1960, 2:92-101.
- 102.-Nichols, A.B., "Bioremediation: Potentials and pitfalls", Water Environ. Technol., 1992, 4(2):52-6.
- 103.-Norma Oficial Mexicana NOM-CRP-004/93; Secretaría de Desarrollo Social.
- 104.-Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-94, Secretaría de Desarrollo Social.

- 105.-NSWMA; Special Report: Medical waste management, National Solid Waste Management Association, USA, 1990.
- 106.-Olson, B.H., "Tracking and using genes in the environment", *Environ. Sci. Technol.*, 1991, 25(4):604-11.
- 107.-O'Reilly, K.T.; R.L. Crawford, "Degradation of pentachlorophenol by polyurethane immobilized *Flavobacterium* cells", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55:2113-2118.
- 108.-Organización Panamericana de la Salud, "Criterios de salud ambiental 2: Difenilos, trifenilos policlorados", Servicio de publicaciones y documentación de la OPS/OMS, México, 1979.
- 109.-Paasivirta, Jaakko, "Chemical ecotoxicology", Lewis Publishers, New York, 1991.
- 110.-Paul, E.A.; F.E. Clark, "Soil Microbiology and biochemistry", Academic Press, Inc., San Diego, 1989, 273 pp.
- 111.-Pelczar, Michael J. Jr.; (et al), "Microbiology. Concepts and applications", McGraw-Hill, 1993, New York, 896 pp.
- 112.-Pignatello, J.J., "Microbial degradation of 1,2-dibromoethane in shallow aquifer materials", *J. Environ. Qual.*, 1987, 16:307-312
- 113.-Ponce, Abad Rocío, "Evaluación de procesos térmicos para el tratamiento de residuos peligrosos", Tesis, Facultad de Química UNAM., 1993.
- 114.-Preussman, R.; M. Wiessler, "The enigma of the organ-specificity of carcinogenic nitrosaminas", *TIPS*, May, 1987, 8:185-189.
- 115.-Racke, Kenneth D.; Joel R. Coats, "Enhanced biodegradation of pesticides in the environment", American Chemical Society, Washington D.C., 1990.
- 116.-Reed, D.T.; (et al), "Environmental restoration and separation science"; en: D.T. Reed & I.R. Tasker, "Environmental Remediation. Removing organic and metal ion pollutants", ACS Symposium Series 509, American Chemical Society, 1992.
- 117.-Reineke, Walter; "Microbial Degradation of Haloaromatics"; *Ann. Rev. Microbiol.*, 1988, 42:263-287.
- 118.-Rhee, Jull, "Long-term study of the anaerobic dechlorination of Aroclor 1254 with and without biphenyl enrichment", *Environm. Science. Technol.*, 1993, April, 27(4):714-719.
- 119.-Rheinheimer, Gerhard, "Microbiología de las aguas", Acirbia, España, 1987.
- 120.-Rittmann, Bruce; Jaqueline MacDonald, "Improving the image of bioremediation", *Water Quality International*, 1993, (4):27-29.
- 121.-Rodríguez, A.; (et al), "Effect of *Penicillium chrysogenum* on lignin transfer", *Appl. Environ. Microbiol.*, Aug, 1994, 60(8):2971-2976.

- 122.-Ross, D., "Use of molecular techniques to assess microbial adaptations to environmental disturbances," Fedrip Database, National Technical Information Service (NTIS), 1992.
- 123.-Ruiz, Morales; Mauricio Alonso, "El desarrollo de los jabones y detergentes en México", Tesis, Facultad de Química UNAM., 1992.
- 124.-Sanchez, Julio C., "Historia antigua", Editorial Cultural, La Habana, Cuba, 1953.
- 125.-Sariaslani, F. Sima, "Microbial Cytochromes P-450 and Xenobiotic Metabolism", Adv. Appl. Microbiol., 1991, 36:133-178.
- 126.-Schepart, B.S.; (et al), "Laboratory evaluation of biodegradation of crude oil contaminated tundra soil", Environment Canada, Ottawa, 15e Colloque technique du programme de lutte contres les deversements d'hydrocarbures en mer et dans l'artique (AMOP), 1992, p689-714.
- 127.-Schlegel, Robert L., "Microbiología General", Omega, Barcelona, 1975.
- 128.-Skeen,R.S.; (et al), "In situ bioremediation of Handford groundwater ", Govt-Reports-Announcements-&-Index-(GRA&I),-Issue-21, 1992.
- 129.-Skeen,R.S.; (et al), "Kinetics of in situ bioremediation of Hanford groundwater", Govt-Reports- Announcements-&-Index, Issue-09, Department of Energy, Washington, DC, 1993.
- 130.-Smith, R.L., "Microbial transformation of Dissolved organic carbon in aquatic environments", Fedrip-Database, National Technical Information Service (NTIS),1992.
- 131.-Sorkhoh,N.; (et al), "Self cleaning of the Gulf", Nature, 1992, 359(6391):109
- 132.-Shannon, Michael J. R. Ronald Unterman, "Evaluating Bioremediation", Ann. Rev. Microbil., 1993, 47:715-38.
- 133.- Speitel, G.E. Jr.; Alley E.R., "Bioremediation of unsaturated soils with chlorinated solvents", J. Hazardous Mater., 1991, 28(1-2):81-90
- 134.-Stotzky,G., (et al), "Selected methods for the detection and assessment of ecological effects resulting from the release of genetically engineered microorganisms to the terrestrial environment"; Adv. Appl. Microbiol., 1993, 38:1-97.
- 135.-Stryer, Lubert., "Bioquímica", 3a ed.,(T1), Reverté, Barcelona, 1990.
- 136.-Sutherland, John B.; (et al), "Metabolism of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Env. Microbiol., Nov., 1991, 57(11):3310-6.
- 137.-Tiedje, James M; Todd O. Stevens, "The ecology of anaerobic dechlorinated consortium", en Omenn, Gilbert S., "Environmental Biotechnology", Plenum Press, New York, 1988, p 3-14.
- 138.-Timmis, K.N.; (et al), "Prospects for laboratory engineering of bacteria to degradate pollutants en:Omenn, Gilbert S., "Environmental Biotechnology". Plenum Press, New York, 1988, p 61-79.
- 139.-Tortora, J. Gerard; (et al), "Microbiology, an Introduction ", 4a ed., The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., California, 1992, 810 pp

- 140.-Thakur, M. S.; (et al), "An environmental assessment of biotechnological processes", Adv. App. Microbiol., 1991, 36:67-80
- 141.-The Pharmaceutical Codex, 11a ed., The Pharmaceutical Press., London, 1979, p 436.
- 142.-Thomas, D.; Georgiou G., "Bioremediation of biphenol by suspended and immobilized cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", J. Hazardous Mater., 1991, 28(1-2):194-195.
- 143.-Tiedje, J.M.; (et al), "Discovery and development of anaerobes for remediation ", EPA. Annual Risk Reduction Engineering Agency Cincinnati (USA), 1993, p 84-88.
- 144.-Topp, Edward; (et al), "Biodegradation of the herbicide Bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzoxynitrile) by purified pentachlorophenol hydroxylase and whole cells of *Flavobacterium sp. strain ATCC 39723* accompanied by cyanogenesis", Appl. Environ. Microbiol., Feb, 1992. 58(2):502-506.
- 145.-Tursman, J.F.; Cork D.J., "Subsurface contaminant bioremediation engineering", Crit. Rev. Environ. Control., 1992, 22(1-2):1-26.
- 146.-Vargas, Huerta Gerardo Noe, "Eliminación de detergentes en aguas residuales", Tesis Facultad de Química UNAM., 1990.
- 147.-Visscher, Pieter T.; Barrie F. Taylor, "A new mechanism for the aerobic catabolism of dimethyl sulfide", Appl. Environ. Microbiol., Nov ,1993, 59(11):3784-3789.
- 148.-Warhurst, A. Michael; (et al), "Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259", Appl. Environ. Microbiol., Apr, 1994, 60(4):1137-1145.
- 149.-Wear, J.E., "Environmental diagnostic analysis of ground water bacteria and their involvement in utilization of aromatic compounds", Department of Energy, Washington, DC., Govt. Reports-Announcement-&-Index (GRA&I), Issue-17, 1993.
- 150.-Wistreich, George A.; Max D. Lechman, "Microbiology", 3a ed., Macmillan Publishing Co., Inc., New York , 1990.
- 151.-Xun, L; C.S. Orser, "Biodegradation of trichlorophenol by cell-free extracts of a pentachlorophenol-degrading *Flavobacterium sp.* " Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, 174:43-48
- 152.- Young, L., "Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls in anaerobic sediments", Environmenta S. T., 1993, 27(3):530-538.
- 153.-Directive 90/220/EEC on the deliberate release into the environment of genetically modified organism; as amended by Directive. 94/15/EEC., Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, USA, 1994.
- 154.-Brewer, Richard, "Ecology", 2nd ed., International Edition, Philadelphia, 1994.