

Artículo publicado en el Repositorio Institucional del IMTA

<i>Título</i>	Uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos.
<i>Autor / Adscripción</i>	Luis G. Torres Bustillos Instituto de Ingeniería, UNAM  Petia Mijailova Gabriela Möeller  Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
<i>Publicación</i>	Ingeniería Hidráulica en México, 12(3): 15-25
<i>Fecha de publicación</i>	1997
<i>Resumen</i>	El desarrollo de la biotecnología ha demostrado que la biodegradación de xenobióticos tóxicos y recalcitrantes es una alternativa realista para el control de la contaminación. En el presente trabajo se realiza un análisis crítico de la aplicabilidad de cepas adaptadas en los dos campos afines de la ingeniería ambiental, el tratamiento de aguas residuales y la biorremediación de suelos y acuíferos.
<i>Identificador</i>	<a href="http://hdl.handle.net/123456789/1272">http://hdl.handle.net/123456789/1272</a>

## Uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos

Luis G. Torres Bustillos

Instituto de Ingeniería, UNAM

Petia Mijailova

Gabriela Möeller

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua

*El desarrollo de la biotecnología ha demostrado que la biodegradación de xenobióticos tóxicos y recalcitrantes es una alternativa realista para el control de la contaminación. En el presente trabajo se realiza un análisis crítico de la aplicabilidad de cepas adaptadas en los dos campos afines de la ingeniería ambiental, el tratamiento de aguas residuales y la biorremediación de suelos y acuíferos. En el mercado actualmente existe una gran cantidad de productos de la biotecnología para biorremediación o intensificación del tratamiento de aguas residuales. La aplicación concreta de estos productos debe ser anticipada por estudios detallados de su aplicabilidad. Los sistemas que los utilizan necesitan un control preciso del proceso de biodegradación. Existen alternativas a la compra de las cepas como son el aislamiento, identificación y evaluación de microorganismos autóctonos, así como la adaptación en cultivo mixto. El procedimiento puede ser por lotes o en continuo reproduciendo las condiciones fisicoquímicas del sistema en el proceso de aclimatación (carga orgánica, pH, temperatura, salinidad o fuerza iónica, ambiente aerobio, anaerobio o anóxico). La mejor cepa adaptada para degradar un cierto contaminante es aquella aislada en el ambiente contaminado por el tóxico específico.*

**Palabras clave:** Cepas adaptadas, biodegradación, xenobióticos, compuestos orgánicos recalcitrantes, biorremediación, aclimatación.

### Introducción

La industrialización y el desarrollo de la vida urbana han dado como resultado la introducción de una amplia gama de compuestos químicos en el ambiente, actualmente reconocida como una amenaza extrema a la capacidad de autorregulación de la biosfera. Un inventario reciente de la Comunidad Europea enumera más de cien mil diferentes sustancias sintetizadas por el hombre; de ellas treinta mil fueron consideradas como un peligro para el ambiente y la salud humana por ser compuestos bioacumulativos, recalcitrantes y/o tóxicos (McEldowney *et al.*, 1993). La disposición inapropiada de los residuos peligrosos y de las descargas no controladas con respecto al contenido de tóxicos han afectado grandemente al medio ambiente. La solución de esta problemática tiene dos aspectos:

- El correctivo que incluye la aplicación de medidas para la remediación de la contaminación provocada y la recuperación de los sistemas afectados.
- El preventivo que mediante tratamientos en la fuente permite evitar la agudización de los problemas.

La prevención es considerablemente menos costosa que la corrección de los efectos negativos. El tratamiento en la fuente debe incluir la remoción de los orgánicos tóxicos y recalcitrantes de los efluentes residuales, sobre todo de los industriales y evitar la propagación de la contaminación al ambiente o el transporte costoso de estas sustancias a los rellenos sanitarios o a los confinamientos. La creciente concientización pública y política con respecto a los efectos del manejo inadecuado de residuos, basado en dilución, entierro o incineración, ha llevado a la consideración de la necesi-

dad de incorporar la remoción de los compuestos tóxicos y recalcitrantes a ambos aspectos preventivos y correctivos de la estrategia para controlar la contaminación ambiental. Para esto es necesario desarrollar nuevas tecnologías, aplicar métodos novedosos tanto físico-químicos, como biológicos y/o sus combinaciones.

El desarrollo de la biotecnología ha demostrado que la biodegradación de compuestos orgánicos específicos es una alternativa realista para el control de la contaminación. El uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos, puede ser aplicable en dos campos afines de la ingeniería ambiental:

- El tratamiento de aguas residuales municipales o industriales.
- La biorremediación de suelos y acuíferos.

### **Tratamiento de aguas residuales**

#### *Aplicación de los procesos biológicos*

El tratamiento biológico ha sido muy exitoso en la remoción de contaminantes orgánicos en estado disuelto y coloidal de las aguas residuales. El propósito del tratamiento biológico es convertir los contaminantes, en general de estructuras complejas, en productos finales simples ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ) y un material sedimentable (biomasa), que pueda ser fácilmente removido del sistema.

La mayoría de los procesos biológicos convencionales de tratamiento de agua se basan en fenómenos biológicos que ocurren en forma natural, pero son llevados a cabo en biorreactores a mayores velocidades. En estos procesos los principales microorganismos responsables de la biodegradación son las bacterias, pero también es importante el papel de otros, como son los protozoarios, rotíferos, hongos y algas.

La dinámica de la población bacteriana en los procesos de tratamiento biológicos depende de varios factores ambientales incluyendo pH, temperatura, tipo y concentración del sustrato, aceptores de hidrógeno, disponibilidad y concentración de los nutrientes y micronutrientes esenciales tales como nitrógeno, fósforo y algunos minerales, presión osmótica, toxicidad del medio o de los productos intermedios, nivel y tipo de mezclado. Dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno, los procesos biológicos pueden ser:

- Aerobios.
- Anaerobios.
- Combinados.

Existen sistemas biológicos de tratamiento en los que los microorganismos están en suspensión, tales como lodos activados convencionales y sus modificaciones, lagunas aeradas y de estabilización, y diferentes tipos de digestores anaerobios.

En otros sistemas la biomasa se encuentra inmovilizada sobre soportes fijos o rotatorios, como son los biofiltros, llamados también filtros percoladores y los contactores rotatorios (biodiscos). Los procesos biológicos se llevan a cabo fundamentalmente en tres tipos de reactores:

- Batch o en lote.
- Continuos de mezcla completa.
- De flujo pistón.

Todas estas tecnologías han encontrado una amplia aplicación inicialmente para el tratamiento de aguas residuales domésticas y después para el tratamiento de efluentes industriales con alto contenido de materia orgánica.

En un principio la aplicación de los sistemas biológicos se dirigió exclusivamente hacia la remoción de la materia orgánica contenida en el agua, medida con los parámetros convencionales Demanda Bioquímica de Oxígeno, Demanda Química de Oxígeno, Sólidos Suspendedos, y a la estabilización de los lodos residuales.

La tecnología era entendida como una *caja negra* y la eficiencia de los procesos frecuentemente era baja. La mayor parte de los sistemas biológicos trabajaban en forma óptima solamente durante dos terceras partes del tiempo (DSTI/STP/BE, 1993). Esto creó la necesidad de fomentar el uso de sistemas de medición y control confiables de los procesos, la optimización y estudio de sus mecanismos y el desarrollo de modelos para pronosticar los resultados y diseñar mejor los sistemas. Como consecuencia de lo anterior, se implantaron procesos modificados, reactores y sistemas más efectivos. Posteriormente, el desarrollo tecnológico se enfocó hacia la remoción de nitrógeno y fósforo.

El entendimiento de que la desnitrificación era un proceso anóxico, permitió realizar modificaciones del reactor biológico convencional, combinando zonas aerobias y anóxicas, que así, logró desarrollar diferentes sistemas, primero para la remoción conjunta de la materia orgánica y del nitrógeno y, posteriormente, para la remoción de materia orgánica, nitrógeno y fósforo. Esta de hecho fue la primera aplicación de microorganismos especializados en la biotecnología del tratamiento de aguas residuales.

Desde que se conoció el efecto de una gran cantidad de compuestos tóxicos y refractarios presentes en las aguas residuales, el foco del desarrollo tecnológico

ha sido extendido hacia la reducción de la toxicidad y la degradación de compuestos orgánicos complejos. Este último enfoque presentó la necesidad de:

- Analizar en detalle los procesos de biodegradación.
- Estudiar el comportamiento, la capacidad y la cinética de biodegradación de compuestos específicos.
- Desarrollar pruebas para identificar los efectos de inhibición.
- Estudiar el proceso de adaptación de microorganismos, las actividades metabólicas y genéticas de las diferentes especies de microorganismos y sus interacciones en la comunidad microbiana que lleva a cabo el proceso de biodegradación (ecología microbiana).

Actualmente, en la literatura se han reportado un buen número de trabajos, en los que por medio de los procesos biológicos se tratan aguas residuales muy complejas, con altas cargas orgánicas y aún con valores altos de toxicidad (Beltrán, 1994).

### *Biodegradabilidad*

La conversión completa de un compuesto orgánico a los productos finales (*i.e.* bióxido de carbono y agua), es denominada mineralización. Un compuesto es biodegradable cuando puede ser convertido por la acción de los microorganismos a otro compuesto más simple. No siempre la biodegradación de un compuesto en los procesos de tratamiento biológicos es completa, éstos pueden ser simplemente transformados a otros, llamados metabolitos intermedios.

En ocasiones, parte de la remoción de algunas sustancias se debe a su bioadsorción en la biomasa que, posteriormente, es separada del sistema.

La persistencia es un estado condicional de los compuestos biodegradables, en el que no pueden ser degradados por la ausencia de condiciones y factores adecuados que hagan posible la biodegradación. Los compuestos orgánicos que no pueden ser oxidados bajo ninguna circunstancia ambiental se clasifican como *refractarios* o *recalcitrantes*.

Se consideran altamente recalcitrantes por ejemplo los pesticidas. En esta categoría están también muchos compuestos aromáticos halogenados y poliaromáticos. Existen, sin embargo, microorganismos capaces de transformar un gran número de compuestos, clasificados como recalcitrantes para la mayoría de los microorganismos, a compuestos que pueden ser utilizados por otras especies de una comunidad microbiana.

En general, son más fácilmente degradables los compuestos solubles que los insolubles. Las molecu-

las orgánicas que pueden atravesar la membrana celular, se degradan más rápidamente. Los materiales de mayor dispersión ofrecen áreas de contacto más extensas con los microorganismos y pueden ser degradados más fácilmente.

Los microorganismos prefieren los compuestos alifáticos y los cicloalifáticos más que los aromáticos. La presencia de un sustituto de carbono en el anillo del benceno generalmente incrementa la biodegradabilidad. Algunos sustitutos del hidrógeno en las moléculas de los compuestos aromáticos o alifáticos, tales como Cl, NO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>H, Br, CN, CF<sub>3</sub>, pueden provocar resistencia a la biodegradación.

A veces el mismo efecto pueden provocar CH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, OH y OCH<sub>3</sub>. La presencia de algunos grupos funcionales, como son: OH, COOH, el grupo amida, ester o anhídrido, generalmente incrementa la biodegradación de los compuestos orgánicos (Alexander, 1994). Un alto grado de ramificación, provoca mayor resistencia a la biodegradación. Los compuestos con enlaces no saturados se degradan más fácilmente que los compuestos de enlaces saturados (Cheremisinoff, 1994). Los compuestos tales como alcoholes, aldehídos, ácidos, amidas y aminoácidos son más biodegradables que los correspondientes alcanos, alquenos, cetonas, ácidos dicarboxílicos, aminas y los cloroalcanos.

Una gran parte de los compuestos recalcitrantes presentan toxicidad a los microorganismos en los sistemas de tratamiento biológico. Algunos compuestos orgánicos son tóxicos a las bacterias en concentraciones menores que las letales. La presencia de contaminantes de este tipo en el influente a las plantas de tratamiento puede afectar la eficiencia de los sistemas biológicos.

Los pesticidas no biodegradables y otros compuestos orgánicos pueden ser parcialmente transformados y en su degradación se pueden formar compuestos intermedios tóxicos, a veces más tóxicos que los originales. Si estas transformaciones son inevitables, se requerirá un proceso de tratamiento adicional, como por ejemplo la adsorción con carbón activado.

### *Bases de la biodegradación*

La biodegradación ocurre debido a la capacidad de los microorganismos de metabolizar la materia orgánica mediante sistemas enzimáticos para producir dióxido de carbono, agua y energía si esta se realiza en medio aerobio. La energía es utilizada para el crecimiento, la reproducción, la movilidad y la respiración de los microorganismos. La materia disuelta es adsorbida dentro de las células y oxidada, pero para convertir las moléculas orgánicas más complejas, tales como las protei-

nas y las grasas, a una forma soluble y adsorbible, las células excretan extracelularmente enzimas que hidrolizan estos compuestos. De aquí que la materia orgánica más compleja necesita más tiempo para ser procesada.

En un proceso biológico, la descomposición de los constituyentes del agua residual se realiza mediante una o más vías que pueden incluir un número grande de compuestos intermediarios. Cada paso en este proceso incluye un sistema enzimático específico, constituido por una o varias enzimas, que son catalizadores orgánicos, producidas por los microorganismos.

Las enzimas son, químicamente, proteínas combinadas con una molécula inorgánica o con una molécula orgánica de bajo peso molecular. Si la producción de una de las enzimas requeridas es inhibida por la presencia de alguna sustancia química, la cadena de reacciones puede bloquearse y presentar acumulación de un compuesto intermedio. Los inhibidores del tratamiento biológico no necesariamente tienen que estar presentes en el sustrato inicial, éstos pueden ser producidos en el mismo proceso mediante biotransformación y mediante la producción de metabolitos cuya velocidad de descomposición es significativamente más baja que la velocidad de su formación.

Las vías enzimáticas requeridas para la descomposición de los carbohidratos, las proteínas y las grasas son muchas, por lo que no se presentan inhibiciones en la oxidación biológica de estos sustratos comunes. Sin embargo, la oxidación de algunas sustancias orgánicas presentes en los efluentes industriales puede incluir mecanismos enzimáticos selectivos y ser muy fácilmente inhibida mediante un bloqueo de al menos una de las reacciones involucradas.

Es posible, sin embargo, identificar varios compuestos (factores de crecimiento), que efectivamente evitan este bloqueo de las reacciones enzimáticas respectivas, cuando son añadidos en pequeñas cantidades al reactor, y de esta forma aceleran la descomposición biológica. Es por esto que algunos efluentes industriales son más fáciles de tratar mezclados con otros efluentes que contengan estos compuestos. Para mejorar la operación del tratamiento biológico de efluentes industriales a veces se recomiendan algunos aditivos-biocatalizadores comercialmente disponibles.

Estos aditivos generalmente contienen una mezcla de enzimas grado técnico, masa bacteriana seca y productos intermedios de fermentación bacteriana. La aplicación de estos aditivos sin previo estudio de la dinámica de la población y del metabolismo microbiano y sin el control preciso de los sistemas, puede incurrir en aumentos sustanciales de los costos sin una aportación real en el tratamiento.

## **Biodegradación de xenobióticos recalcitrantes y tóxicos**

Los estudios sobre la biodegradación de contaminantes específicos presentes en las descargas de algunos sectores industriales empiezan en las décadas de los años 60 y 70. En los casos de degradación de hidrocarburos y detergentes, la adición de co-sustratos y nutrientes a sistemas de lodos activados han sido exitosamente utilizados para estimular el proceso de degradación.

Está bien documentada la biodegradabilidad aerobia de aromáticos sustituidos, cuyos anillos son transformados a derivados dihidroxilados mediante mono y dioxidación antes del rompimiento del anillo (Hayaishi, 1964; Dagley, 1975; Fewson, 1981; Gibson y Subramanian, 1984).

Existe información disponible sobre biodegradación anaerobia de algunos aromáticos sustituidos que siguen vías reductivas (Evans, 1977; Balba y Evans, 1980 *a y b*; Healy *et al.*, 1980; Boyd y Shelton, 1984). Una gran cantidad de estudios sobre biodegradación aerobia y anaerobia han demostrado que en un ambiente de sustrato múltiple, los compuestos estructuralmente relacionados tienen un efecto similar sobre la velocidad metabólica neta (Zollinger, 1966; Chou *et al.*, 1978; Haller y Finn, 1978; Deshpande y Chakrabarti, 1988; Godbole y Chakrabarti, 1991).

Muchos autores observaron y describieron los efectos de antagonismo y sinergismo en los sistemas de tratamiento. Bauer and Capone (1988) demostraron que el naftaleno estimula la biodegradación del fenantreno pero no la del antraceno. Arvin *et al.* (1989) demostraron la interacción de sustratos aromáticos durante la biodegradación del benceno.

Los autores reportan que el tolueno y el xileno tuvieron un efecto antagónico sobre la utilización del benceno. Smith *et al.* (1991) observaron inhibición completa del crecimiento de *Pseudomonas sp.* en una mezcla de bifenilo y etilbenceno, aunque ambos compuestos son biodegradables cuando están presentes individualmente.

Latkar M. y Chakrabarti (1994) estudiaron la degradación anaerobia de tres fenoles dihídricos (resorcinol, catecol y hidroxiquinona) en sustratos mono- y binarios en tres reactores anaerobios de película fija y flujo ascendente aclimatados a estos compuestos hidroxiaromáticos. Se llegó a la conclusión que el resorcinol, el catecol y la hidroquinona son fácilmente degradables en condiciones anaerobias.

Los trabajos anteriormente mencionados se han desarrollado en el aspecto de biodegradabilidad de compuestos específicos. Existen también estudios en

el aspecto de identificación de los microorganismos que constituyen la biocomunidad en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, sus interacciones y capacidad de biodegradación. Hasta el momento, sin embargo, más del 80% de las especies presentes en estas comunidades necesitan todavía ser aislados e identificados (DSTI/STP/BE, 1993). El crecimiento y la predominancia de algunas especies de microorganismos son determinados por muchas circunstancias incluyendo el tipo de la materia orgánica en los efluentes y la velocidad del metabolismo, entre otros. La predominancia de ciertos microorganismos puede ser un indicador de la presencia de algún contaminante específico y de la eficiencia de tratamiento. En la tabla 1 se enumeran algunos microorganismos involucrados con la degradación de contaminantes orgánicos (Cheremisinoff, 1994).

Se ha visto que muchos microorganismos pueden usar compuestos xenobióticos para su crecimiento o degradarlos por varios mecanismos. Los trabajos de aislamiento e identificación se enfocaron primero a los microorganismos capaces de degradar tóxicos orgánicos. Como resultado, en la literatura se han reportado muchas especies capaces de degradar tóxicos específicos, ya sea dentro de un sistema de lodos activa-

dos, o bien aisladamente. Entre ellas encontramos los géneros de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Nitrosomonas*, *Rhodococcus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Staphylococcus*, *Desulfovibrio*, *Acetobacterium*, *Pelobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Citrobacter* y *Achromobacter* (Torres et al, 1996). En la degradación de fluoreno (uno de los 16 hidrocarburos policíclicos, considerados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como tóxicos prioritarios), se ha identificado a *Arthrobacter sp.*, aislada de un sistema de lodos activados de una refinería de petróleo (Grifoll, 1992). Una degradación completa del ácido 4-clorobenzoico ha presentado en condiciones aerobias al género *Acinetobacter sp.*, aislado de una muestra de suelo (Tobita, 1992).

Una razón por la que las bacterias son eficientes en la biodegradación es que éstas son capaces de utilizar una fuente de carbono de moléculas diferentes a las que ellas normalmente utilizan. Muchos compuestos inertes bioquímicamente, tales como los alcanos, las estructuras de anillo saturado y el benceno no sustituido no tienen oxígeno y no son sujetos a reacciones de hidrogenación. La habilidad de las bacterias para utilizar estos compuestos se basa en el hecho de que éstas pueden catalizar la oxidación utilizando oxígeno.

**1. Microorganismos involucrados en la degradación de varios contaminantes orgánicos en sistemas de tratamiento de aguas residuales**

Contaminante	Microorganismos
Hidrocarburos del petróleo	Más de 200 especies de bacterias, levaduras y hongos
Pesticidas/herbicidas del tipo ciclodieno (aldrín, dieldrín)	<i>Zylerion xilestrix</i>
Pesticidas/herbicidas del tipo organofosforados (paratión, malatión)	<i>Pseudomonas sp.</i>
2,4 -D	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>athrobacter sp.</i>
DDT	<i>Penicillium sp.</i>
Kepona	<i>Pseudomonas sp.</i>
Ácido piperonílico	<i>Pseudomonas sp.</i>
Bis (2-etilhexil) ftalato	<i>Serratia marcescens</i>
Dimetilnitrosamina	Bacterias fotosintéticas
Etilbenceno	<i>Nocardia tartaricans</i>
Pentaclorofenol	<i>Pseudomonas sp.</i>
Residuos de celulosa en el agua residual municipal	<i>Pseudomonas sp.</i> , <i>thermonospora</i>
Efluentes fenólicos de fabricación de pulpa y papel	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Athrobacter sp.</i> , <i>chromobacter sp.</i> , <i>pseudomonas sp.</i> , <i>xanthomonas sp.</i>

De lo anterior se puede concluir que en el desarrollo de un proceso de tratamiento biológico y en el diseño de los reactores son de gran importancia la fisiología de las comunidades que participan en el proceso degradativo y las actividades metabólicas y genéticas que controlan la capacidad y la expresión de estas actividades degradativas.

Con base en estas consideraciones, las velocidades de descomposición de los compuestos xenobóticos recalcitrantes y tóxicos pueden ser importantemente acelerados utilizando cepas adaptadas, las cuales pueden tener las siguientes aplicaciones concretas:

- Intensificación de los procesos biológicos, aumentando la capacidad de tratamiento de una planta u optimizando la degradación de compuestos específicos.
- Auxiliar en la sana operación del proceso cuando existen problemas como el exceso de grasas, almidón, celulosa, proteínas o carbohidratos.
- Eliminación con mejores capacidades de compuestos tóxicos refractarios, tales como polihalogenados, fenólicos, cianuros, alilaminas, e hidrocarburos en general.
- Aumento de la capacidad de los sistemas para la eliminación de nutrientes específicos, como el nitrógeno y el fósforo.

### **Biorremediación**

Se conoce como biorremediación al proceso que los microorganismos usan para transformar sustancias peligrosas en compuestos no-tóxicos (US EPA, 1991). El proceso de biorremediación es aplicable tanto a suelos como a acuíferos contaminados.

Las tecnologías de biorremediación para el tratamiento de suelos y aguas contaminadas puede dividirse en varias categorías:

- Tratamiento en fase sólida. Se puede aplicar en forma de cultivo de suelo (en pilas de tierra) o de composteo. El composteo consiste en la mezcla de tierra contaminada con materiales acondicionadores tales como paja, corteza, aserrín, bagazo u otros esquilmos agrícolas.
- Tratamiento en fase lodosa. Consiste en tratar la tierra en un bio-reactor, en el cual se mezcla la tierra a tratar y cierta cantidad de agua y nutrientes para obtener un lodo manejable.
- Tratamiento *in situ*. Se diferencia de los anteriores procedimientos en el hecho de que no requiere de efectuar excavaciones ni transferencia de materiales, pues consiste en la inyección directa de solucio-

nes nutrientes oxigenadas (en ocasiones inoculadas con microorganismos específicos) con el fin de estimular o amplificar la actividad microbiana natural.

- Tratamientos combinados (Chow *et al.*, 1992). Como su nombre lo indica, consisten en la aplicación de más de un tipo de tratamiento simultáneamente *i.e.* composteo de la capa superficial de tierra e inyección de microorganismos hacia las capas inferiores.

En la literatura se han reportado muchas bacterias, hongos y levaduras con potencial para la biorremediación. En el cuadro 2 se presentan algunos de los microorganismos utilizados en la bioremediación que tienen la capacidad de degradar compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos. Entre los géneros que se mencionan se incluyen bacterias aerobias (*i.e.* *Pseudomonas*, *Bacillus*) y anaerobias (*i.e.* *Methanospirillum*, *Methanosarcina*), así como sulfato-reductoras (*i.e.* *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*). Destacan por el número de substratos que emplean los géneros *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Phanerochaete*, *Desulfobacterium* y *Pseudomonas* (Beltrán, 1994).

### **La ingeniería genética y la adaptación de microorganismos a la degradación de tóxicos**

La ingeniería genética ha jugado un papel importante en la adaptación de microorganismos a la degradación de tóxicos, sin embargo, no es una práctica común utilizar microorganismos modificados genéticamente para la biodegradación de compuestos recalcitrantes o tóxicos, ya que la liberación de estos microorganismos está controlada (IICA, 1990).

Sin embargo, la modificación de material genético ha sido una herramienta fundamental en la selección y adaptación de microorganismos, ya sea como auxiliar en la detección de microorganismos potencialmente útiles (Diels y Mergeay, 1990), en el estudio de los mecanismos de degradación y las secuencias genómicas de los microorganismos aptos (Silver *et al.*, 1989; Coco *et al.*, 1993), en el establecimiento de la evolución de los microorganismos con capacidad de biodegradación en términos genéticos (Rothmel *et al.*, 1990) y en el estudio de cómo el ambiente modula la actividad microbiana, factor clave para el desarrollo de la biorremediación (Daubaras y Chakrabarty, 1992).

### **Cepas adaptadas que oferta el mercado internacional**

Cada vez es mayor el número de compañías que lanzan al mercado productos desarrollados a través de la biotecnología. Un número importante de proteínas, en-

## 2. Microorganismos utilizados en la biorremediación con potencial para degradar compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos

Micorganismo:	Tóxico (substrato)
<i>Pseudomonas putida</i>	1,4-diclorobenceno, 3-clorobenzoato, 3-metilbenzoato, fenol, 4-clorofenol.
<i>Criptomococcus elinovii</i>	Fenol
<i>Methanosarcina barkeri</i>	O-fenilfenol
<i>Alcaligenes sp</i>	4-clorofenol, 4-clorofenol
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pentacloro-fenol, Acido 2,4,5-triclorofenoxiacético
<i>Bacillus subtilis</i>	Guayacol gliceril-eter
<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i>	Tetracloro-hidroquinona, Fenol, 2,3,6-triclorofenol, 2,3,5- triclorofenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol, 2,3,4,6- tetraclorofenol, 2,3,4,5-tetraclorofenol, pentaclorofenol, 3,4,6 tricloroguaiacol, 3,5,6-tricloroguaiacol, 3,5- dicloroguaiacol, 3,6-dicloroguaiacol, 3,4,6-triclorosiringol, 3,5-diclorosiringol, para-hidroquinonas cloradas, tetracloro hidroquinona.
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	3-clorobenzoato, 3-metilbenzoato
<i>Escherichia coli</i>	Fenol
<i>Candida parapsilosis</i>	Alcanos
<i>Rhodococcus sp</i>	Tetrahidroquinonas, clorofenol
<i>Acinetobacter sp</i>	Ácido 4-clorobenzoico
<i>Rhodococcus rhodococcus</i>	Pentaclorofenol
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Bromo, fluoro y clorofenol
<i>Desulfosarcina sp</i>	Ácido fenilacético
<i>Fusarium flocciferum</i>	Fenol
<i>Pseudomona stutzeri</i>	Polietilenglicoles
<i>Penicillium frequentans</i>	Alcanos
<i>Desulfobacterium phenolicum</i>	Formato, acetato, butirato, etanol, propanol, butanol, piruvato, malato, fumarato, maleinato, succinato, glutarato, ciclohexan-carboxilato, fenol, p-cresol, benzoato, fenil-acetato, 2-hidroxi-benzoato, 4-hidroxi-benzoato, 4-hidroxifenil-acetato, 2-amino-benzoato, indol, fenilalanina.
<i>Camamonas acidovorans</i>	Quinolina
<i>Cryptococcus elinovii</i>	Fenol
<i>Methanosarcina formicim</i>	Ácido fenilacético
<i>Pseudomona sp.</i>	Fenol, 4-clorofenol, 3,4-diclorofenol, 2,3,5,6-tetraclorofenol, pentaclorofenol, 3-clorobenzoato, 3-metilbenzoato, tolueno, p-xileno, benceno, clorobenceno, diclorobenceno, etanol, butanol, octanol, 2,4-dinitrotolueno, herbicidas, ácido fenoxiacético, 2-cloroalilalcohol.
<i>Candida sp.</i>	Fenol
<i>Alcaligenes sp.</i>	4-clorofenol, 1,4 diclorobenceno
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fenol
<i>Staphylococcus auriculans</i>	Dibenzofurano, fluoreno, dibenzo-p-dioxina
<i>Pseudomona picketii</i>	2,4,6 triclorofenol.
<i>Desulfovibrio sp.</i>	Hidrocarburos saturados ( <i>i.e.</i> hexadecano)
<i>Moraxella sp.</i>	p-nitrofenol
<i>Aeromonas sp.</i>	Aceites crudos
<i>Desulfobacterium indolicum</i>	Formato, acetato, propionato, etanol, propanol, butanol, piruvato, malato, fumarato, maleinato, succinato, aminobenzoato, indol, quinolina.
<i>Desulfobacula toluolica</i>	Tolueno
<i>Methanospirillum hungatei</i>	Fenol

zimas, carbohidratos, metabolitos secundarios y polímeros producidos por fermentación son ofertados con aplicaciones en salud, alimentación, química, agroindustria y ambiental.

Desde la década de los años 80, paralelamente al desarrollo de las tecnologías de biorremediación, se empezaron a desarrollar microorganismos con capacidades específicas, aplicables a los diversos problemas de tratamiento de extensiones de tierra, cuencas y corrientes subterráneas contaminados.

El proceso de aislamiento y adaptación de microorganismos a la degradación de tóxicos, empieza generalmente con la selección de sitios contaminados que son el habitat natural de los microorganismos a que nos referimos. Esto significa que si se pretende obtener una bacteria con alta capacidad para degradar pentaclorofenol, el mejor sitio para buscarla es en un lote donde se almacenan tambores de este preservador de madera, por ejemplo. Una vez que se toman muestras del sitio contaminado (en tierra, agua, etc.), se procede a su aislamiento e identificación (este paso no siempre es indispensable) y posteriormente se evalúan las capacidades de cada cepa identificada, cre-

ciéndola en presencia del compuesto de interés como única fuente de carbón, en concentraciones cada vez mayores, hasta identificar el límite de inhibición de crecimiento.

Como se mencionó en un apartado previo, algunas técnicas biotecnológicas son aplicadas (entre ellas la ingeniería genética) para hacer más efectivo el proceso de adaptación. A éstos procedimientos se les llama hoy en día bio-estimulación. Generalmente no se hacen modificaciones genéticas en las cepas, ya que esto constituiría un problema para su liberación. Más bien se ha dado en utilizar microorganismos modificados genéticamente, para realizar estudios de tolerancia a los tóxicos y para ayudar a establecer los mecanismos de degradación (pasos involucrados, enzimas que participan en la transformación, balance energético).

Las cepas se producen masivamente por cultivo sumergido, previa identificación de las condiciones óptimas de cultivo para expresar las actividades enzimáticas tan intensamente como sea posible. La biomasa microbiana se flocula y sedimenta, o bien se procesa en centrífuga de canasta tipo Sharples. Finalmente se seca en un secador de lecho fluidizado preferente-

### 3. Productos biotecnológicos ofrecidos por dos compañías: Polybac Co. (Betlehem P.A. USA) y Kam Biotechnology (Surrey, British Columbia, Canada)<sup>tm</sup>

Producto	Usos
PHENOBAC <sup>a</sup>	Degrada hidrocarburos tales como bencenos, fenoles, cresoles, naftalenos, aminas, alcoholes alifáticos e hidrocarburos aromáticos, metacrilatos, nitrilos, detergentes y surfactantes sintéticos, gasolina, keroseno, combustóleo, formaldehído, glicoles, fenoles etoxilados, ceras y compuestos heterocíclicos como la morfolina y la piridina.
PETROBAC <sup>a</sup>	Degrada aceite crudo y procesado, así como otros hidrocarburos refinados en ambientes salinos.
FIBROBAC <sup>a</sup>	Empleado en sistemas de tratamiento de aguas residuales, operaciones de composteo, tratamiento de desechos sólidos vegetales.
LIGNOBAC <sup>a</sup>	Degrada celulosa, almidón, lignina y taninos. Aplicable a las aguas residuales del proceso de molienda de pulpa o manufactura de papel.
AGRIGEST <sup>a</sup>	Deodorización y licuefacción de desechos animales. Mezcla de microorganismos y enzimas.
HYDROBAC <sup>a</sup>	Degrada aceites y residuos de refinería, surfactantes, ceras, sulfitos, mercaptanos, compuestos fenólicos, cianuros y cresilatos.
BIO-ZYME 2500 <sup>TM</sup>	Degrada comp. orgánicos polihalogenados, herbicidas, insecticidas, dioxinas, PCB, haluros de arilo, aminas alifáticas, aril-aminas, etc.
BIO-ZYME SM-450 L <sup>TM</sup>	Degrada detergentes, papel, aceite, grasa, hidrocarburos, fenoles, etc.
BIO-ZYME TD500-L <sup>TM</sup>	Digestor de grasas
BIO-ZYME 3001-DX <sup>TM</sup>	Auxiliar en el tratamiento de aguas residuales municipales, ayuda en el control de sulfuros.
BIO-ZYME SM 700 <sup>TM</sup>	Degrada proteínas complejas, almidón, grasas, celulosa, detergentes y gomas vegetales.
BIO-ZYME 1500 <sup>TM</sup>	Biodegradación de cianuros orgánicos e inorgánicos. Se recomienda aplicar en plantas de tratamiento de aguas residuales.

mente y se formula, mezclándola con protectores y aún con enzimas que coadyuvan a la biodegradación. Los productos generalmente son mezclas de cepas con espectros de degradación más o menos amplios.

En el cuadro 3 se enlistan varios productos desarrollados por dos compañías (POLYBAC, 1995; KAM, 1995). La presentación de los productos varía dependiendo de la compañía que la oferta y el volumen de venta. Cada compañía promueve su producto y presenta las especificaciones y indicaciones generales para su aplicación.

Se proporcionan también eficiencias de su funcionamiento y parámetros mínimos, máximos y óptimos a controlar, entre los que resaltan el pH, oxígeno disuelto, relación carbono-nitrógeno-fósforo (C/N/P), temperatura, contenido de metales pesados. En algunos casos puede requerirse mezclar un producto microbiológico y otro enzimático. Las bondades de los productos serán ratificados o rectificadas por el cliente según el tipo de desecho a tratar.

#### **Alternativas a la compra de cepas adaptadas: cepas puras o cultivos mixtos**

##### *Cepas puras*

Una cepa se obtiene a partir de aislamiento, identificación y evaluación de microorganismos que son hábiles en la degradación de compuestos de interés. Esta alternativa es factible y sencilla si se cuenta de un equipo multidisciplinario integrado básicamente por un microbiólogo, un químico y un ingeniero.

Las cepas pueden aislarse a partir de plantas de tratamiento de aguas residuales industriales o bien en sitios aledaños a la descarga, o en terrenos contaminados con el compuesto de interés.

El muestreo debe de ser representativo para reunir un número suficiente de muestras para la evaluación y selección de los microorganismos con mayor capacidad de degradación. Pueden también adquirirse cepas de colección que de antemano se conozca sean degradadoras eficientes del o de los compuestos a tratar iniciando el proceso de estimulación y propagación.

##### *Cultivo mixto*

Esta técnica consiste en adaptar una mezcla de diferentes microorganismos para que estos sean capaces de degradar compuestos tóxicos y/o recalcitrantes en concentraciones cada vez mayores. Los trabajos de Strenstrom *et al.* (1989), Kobayashi *et al.* (1989), Buitrón *et al.* (1993 a, b), Kiilerich *et al.* (1993), por citar

sólo algunos, son un ejemplo de dichos procedimientos. En México, pueden mencionarse los trabajos de Moeller y Fernández (1986), Ramírez *et al.* (1994), González y Buitrón (1995), y Torres *et al.* (1996) entre otros.

#### **Conclusiones**

Por lo antes expuesto, podemos concluir que el uso de las cepas adaptadas, a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos, puede intensificar los procesos biológicos aumentando la capacidad de tratamiento de una planta, puede también auxiliar en la sana operación del proceso cuando existen problemas como el exceso de grasas, proteínas o carbohidratos, etc. y eliminando con mejores capacidades algunos compuestos tóxicos. Esto no significa que las cepas deban ser adquiridas comercialmente en forma de concentrados, liofilizados o mezclas de emulsificantes, enzimas y microorganismos.

Como ya se discutió en párrafos anteriores, es factible y deseable llevar a cabo un procedimiento de aislamiento y adaptación con microorganismos presentes en el sistema (suelo, agua, etc.) o bien de fuentes cercanas. Esta intensificación de actividad bacteriana puede estimularse sobre cepas puras (identificados o no) o bien sobre consorcios bacterianos, siendo esto lo más recomendable. El procedimiento puede ser por lotes o en continuo y lo más importante es reproducir las condiciones fisicoquímicas del sistema en el evento de aclimatación (carga orgánica, pH, temperatura, salinidad o fuerza iónica, ambiente aerobio, anaerobio o anóxico).

La naturaleza en su inmensa capacidad de autodepuración, es capaz de seleccionar microorganismos con habilidad para degradar compuestos tóxicos xenobióticos (desarrollados por el hombre), nunca antes existentes en el suelo o en el agua. La mejor cepa adaptada para degradar un cierto contaminante es aquella que fue aislada en el ambiente contaminado por el tóxico específico.

Recibido: diciembre, 1995

Aprobado: marzo, 1997

#### **Referencias**

- Alexander M. (1994) Biodegradation and bioremediation, California: Academic Press Inc., 302p.
- Arvin E., Jencen B.K. and Gunderstone A.T. (1989) Substrate interactions during the aerobic degradation of benzene. *Appl. Envir. Microbiol.* 55, 3221-3225.
- Balba M. T., W.C. Evans (1980 a) The anaerobic dissimilation of benzoate by *Pseudomonas aeruginosa* coupled with

- Desulfovibrio vulnificans*, with sulfate as a terminal electron acceptor. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 624-625.
- Balba M. T., W.C. Evans (1980 b) The methanogenic biodegradation of catechol by a microbial consortium: evidence of the production of phenol through cisbenzenediol. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 452-454.
- Bauer, E.J. and D.G. Capone (1988). Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Applied and environmental microbiology.* 54:1649-1655.
- Beltrán N.A. (1994) Biodegradación aerobia de tóxicos por medio de microorganismos inmovilizados. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Boyd S.A., D.R. Shelton D.R. (1984) Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl. Envir. Microbiol.* 47, 272-277.
- Buitrón G., A. Koefoed and B Capdeville (1993 a) Control of phenol biodegradation by using CO<sub>2</sub> evolution rate as an activity indicator. *Environmental Technology* 14, 227-236.
- Buitrón G., B. Capdeville and P. Horny (1993 b) Improvement and control of the microbial activity of a mixed population for degradation of xenobiotic compounds. En: 1st. International specialized conference on microorganisms in activated sludge and biofilm process, Paris, France.
- Cheremisinoff P.N. (1994) Biomanagement of wastewater and wastes, PTR Prentice Hall, New Jersey, 221p.
- Chou W.I., R.E. Speece, R.H. Siddiqui (1978) Acclimation and degradation of petrochemical wastewater components by methane fermentation. In *Biotech. Bioenging. Simp. No.8* (Edited by Gollen J.E.L.), Wiley, New York, 391-428.
- Chow S. R. del Río y R. Castillo (1992) Biorremediación, tecnología para degradar contaminantes. *Revista IMIQ*, Agosto 33, vol. 2<sup>a</sup>, 37-50.
- Coco W.M., R.K. Rothmel, S. Henikoff and A.M. Chakrabarty (1993) Nucleotide sequence and initial functional characterization of the *c/cR* gene encoding a LysR family activator of the *c/cABD* chlorocatechol operon in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 175(2), 417-427.
- Dagley S. (1975) *Essays. Biochem.* 11, 81 -138.
- Daubaras D. and A.M. Chakrabarty(1992). The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. *Biodegradation* 3, 125- 135.
- Deshpande S.D. and T. Chakrabarti (1988) Biodegradation of xenobiotics from binary substrate system using acclimated activated sludge. *Indian J. Envir. Hlth* 30, 215-221.
- Diels L. and M. Mergeay (1990) DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 56(5), 1485-1491.
- DSTI/STP/BE, Directorate for Science, Technology and Industry (1993) *Biotechnology for a clean environment: Prevention, Detection and Remediation*, Report drafted by the "Ad Hoc Group of Government Experts on Biotechnology for a Clean Environment", Paris, p.32, 141.
- Evans W.C. (1977) Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature* 270, 17-22.
- Fewson C.A. (1981) Biodegradation of aromatics with industrial relevance. In *Microbiological Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds* (FEMS Simp. Ser. 12). (Edited by Leisinger T., Cook A.M., Hutter R. and Nuesch J.), Academic Press, London, pp.141 -179.
- Gibson D.T. and V. Subramanian (1984) Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In *Microbial Degradation of Organic Compounds* (edited by Gibson D.T.), pp.181-251. Dekker, New York.
- Godbole A., T. and Chakrabarti (1991) Biodegradation in up-flow anoxic fixed-film fixed bed reactors of resorcinol, catechol and phenol in mono and binary substrates matrices. *Wat. Res.* 25, 1113-1120.
- González A. y Buitrón (1995). Estudio de la dinámica de poblaciones de los lodos activados en un proceso biológico utilizado para el tratamiento de efluentes contaminados con compuestos fenólicos. VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Ixtapa, Gro., 10-14 Sept. de 1995.
- Grifoll (1992) Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept., 2910-2915.
- Haller H.D. and R.K. Finn (1978) Kinetics of biodegradation of p-nitrobenzene and inhibition by benzoate in a pseudomonad. *Appl. Envir. Microbiol.* 35,890-896.
- Hayaishi O. (1964) Plenary Sessions Sixth Internat. Congr. Biochemistry, New York City, I.U. B.33, 31.
- Healy J.B., L.Y. Young, M.Reinhard (1980) Biodegradation of the aromatic compound ferulic acid to methane. *Appl. Envir. Microbiol.* 39, 436-444.
- IICA (1990) Guías para la liberación en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. Organización de los Estados Americanos, Organismo Internacional de Epizootias. Programa I: Generación y Transferencia de Tecnología.
- KAM Biotechnology (1995). Technical data. Surrey, British Columbia, CANADA.
- Kiilerich O., G. Buitrón y B. Capdeville (1993) Use of a sequencing batch reactor to study the biodegradation of a 4-chlorophenol in soil. *Biotechnology Techniques* 7(2), 149-154.
- Kobayashi T., T. Hashinaga, E.Mikami, T.Suzuki (1989) Methanogenic degradation of phenol and benzoate in acclimated sludges. *Wat. Sci. Technol.* 21, 55-65.
- Latkar M., T. Chakrabarti (1994) Resorcinol, catechol and hydroquinone biodegradation in mono and binary substrate matrices in upflow anaerobic fixed-film fixed-bed reactors. *Wat. Res.* 28, 599-607.
- McEldowney Sh., D.J. Hardman, S. Waite (1993) *Pollution: ecology and biotreatment*, edited by Longman Scientific & Technical, England, p. 322.
- Moeller G. y G. Fernández (1986) Adaptación de microorganismos para la biodegradación de detergentes tipo ABS. *Memorias del Congreso Nacional de la SMISA*. Puebla, 20-25.
- Polibac Corp. (1995). *Product Information Booklet*. Bethlehem PA. USA.
- Ramírez E. C., Mijaylova P.N., Torres L.B., Cardoso L.V. y López S.A. (1994) Reducción de toxicidad en efluentes

- de síntesis orgánica. Informe final del Proyecto UI9413, IMTA/CTCA, 307 p.
- Rothmel R.K., R.A. Haugland, U.M.X. Sandokar, W.M. Coco and A.M. Chakrabarty (1990) Microbial degradation of synthetic chlorinated compounds: evolutionary implications. In: *Biodegradation and Biodegradation 8*, ed. by H. W. Rossmore ( Edit.), Elsevier Applied Science.
- Silver S., T. Misra and R. Laddaga (1989) DNA sequence analysis of bacterial toxic heavy metal resistances. *Biological Trace Element Research*. 21, 148-163.
- Smith M.R., M. Ewing, C. Ratledge (1991) The interactions of various aromatic substrates degraded by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643: synergistic inhibition of growth by two compounds which serve as growth substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 111-121.
- Strenstrom M.K., L. Cardinal and J. Libra (1989) Treatment of Hazardous substances in wastewater treatment plants. *Environmental Process*. 8(2), 107-112.
- Tobita Iyobe (1992) Total degradation of 4-chlorobenzoic acid, *Wat. Sci.* 25, 89-95.
- Torres, L.G., N. Campos, B.E. Jiménez, P. Mijaylova and E. Ramírez (1996) Isolation and identification of bacteria present in an activated sludge system treating highly toxic industrial wastewater. *Water Sci. and Tech.* (Submitted).
- United States Environmental Protection Agency (1991) *Understanding Bioremediation . A guide for citizens.* EPA/540/2-91/002.
- Zollinger E. S. (1966) Effects of inhibition and repression on the utilization of substrates by heterogenous bacterial communities. *Appl. Microbiol.* 14, 654-658.

#### Abstract

Torres-Bustillos, L.G.; P. Mijailova; G. Möeller. "Modified strains in the degradation of recalcitrant and toxic organic compounds". *Hydraulic Engineering in Mexico (in Spanish)*. Vol XII Num. 3, pages 15-25, September-December, 1997.

Advances in biotechnology have shown that the degradation of toxic and recalcitrant xenobiotics is a viable alternative for pollution control. A critical analysis is offered of the applicability of modified strains in the two related fields of environmental engineering: wastewater treatment and bioremediation of soils and aquifers. There is a variety of products on the market for bioremediation or intensification of wastewater treatment. The application of these products should be preceded by detailed feasibility studies. The systems where they are used must offer precise control over the biodegradation process. An alternative to the purchase of commercially available strains is the isolation, identification and evaluation of indigenous microorganisms, and the adaptation of mixed cultures. Batch or lot processes that reproduce the physico-chemical parameters of the system may be used to acclimate the organisms. The parameters include organic load, pH, temperature, salinity or ionic strength, and the prevalence of an aerobic, anaerobic or anoxic environment. The microorganism best adapted to the degradation of a given pollutant is isolated from an environment in which the toxic is present.

**Key words:** Modified strains, biodegradation, xenobiotics, recalcitrant organic compounds, bioremediation, refractori.