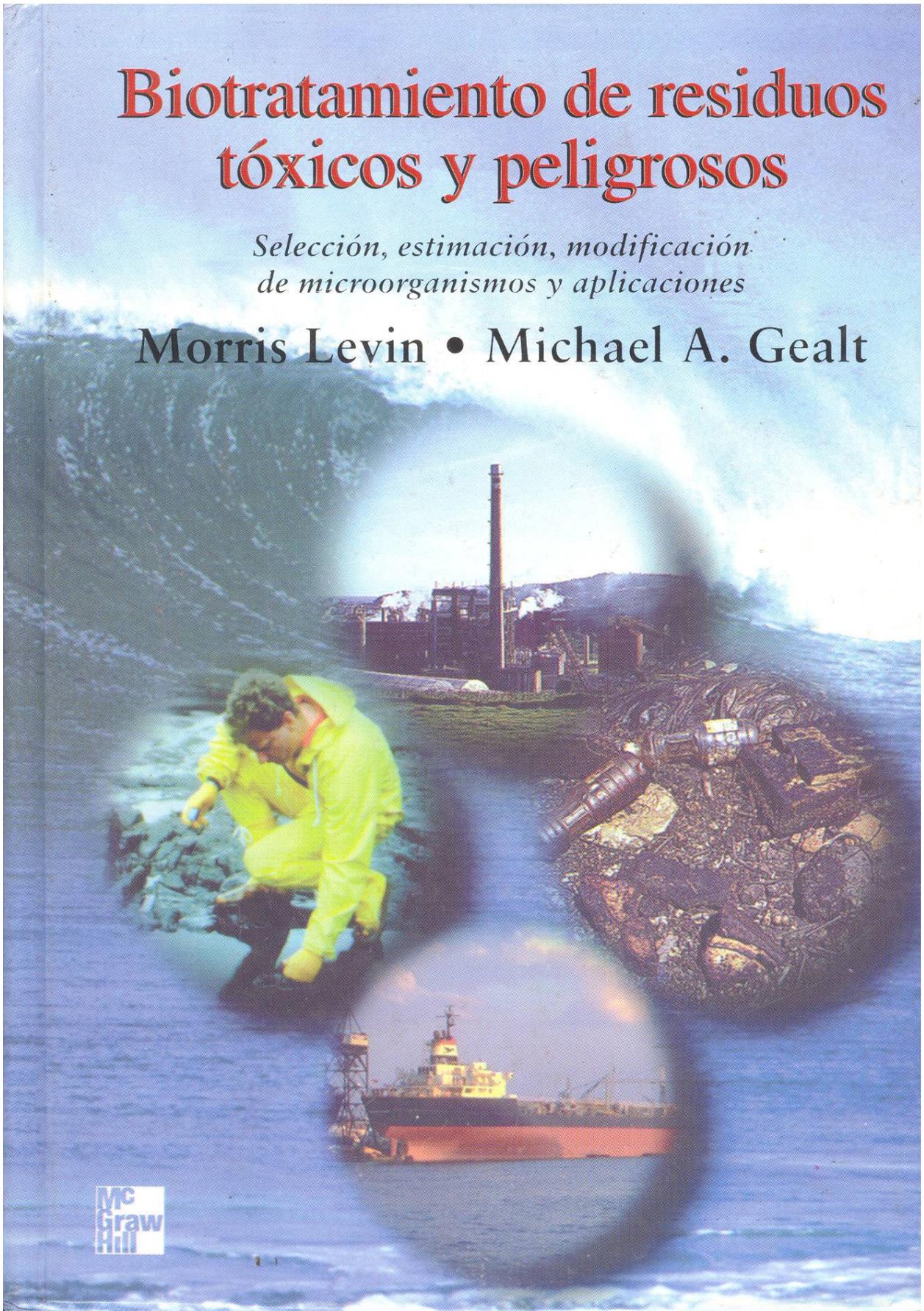


Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos

Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones

Morris Levin • Michael A. Gealt



Mc
Graw
Hill

BIOTRATAMIENTO DE RESIDUOS TÓXICOS Y PELIGROSOS

Selección, estimación, modificación
de microorganismos y aplicaciones

MANUALES MCGRAW-HILL DE INGENIERÍA Y CIENCIA

9701003888	AUSTIN. Manual de procesos químicos en la industria.
0000000000	AWWA. Tecnología de separación de agua por membrana.
0000000000	CANTER. Evaluación del impacto ambiental.
9701013425	CASCIO. Guía ISO 14000
9701013417	CLEMENTS. Prepare a su empresa para el sistema de calidad QS-9000.
8448107527	FIKSEL. Ingeniería de diseño medioambiental.
9701008715	FINK. Manual de ingeniería eléctrica. 2 vols.
8476158335	FINK. Manual de ingeniería electrónica. 5 vols.
8448105745	GARCÍA-BADELL. Cálculo por computadora de estructuras hormigón armado. 2.ª ed.
8448106636	GRIMM. Manual de diseño de calefacción, ventilación y aire acondicionado.
8448116194	HARRIS. Manual de medidas acústicas y control del ruido.
8448105869	HARRISON. Manual de auditoría medioambiental. Higiene y seguridad.
0000000000	HARRISON. Auditoría de gestión medioambiental.
9701008081	HERRO. Guía Nalco para el análisis de fallas en los sistemas de enfriamiento por agua.
8448100557	JURAN. Manual de control de calidad. 2 vols. 4.ª ed.
8448107128	LAGREGA. Gestión de residuos tóxicos.
9701008243	LANE. Control de incrustaciones y corrosión en instalaciones hidráulicas en edificios.
0000000000	LEVIN. Tratamiento biológico de las aguas residuales industriales.
8448105834	LUND. Manual McGraw-Hill de reciclaje.
9701009177	MACLEAN. Documentación de Calidad para ISO 9000.
9701010574	MAYNARD. Manual del ingeniero industrial. 4.ª ed.
9701000145	MERRITT. Manual del ingeniero civil. 2 vols. 3.ª ed.
8448116070	METCALF. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización.
8448115503	METCALF. Ingeniería de aguas residuales. Redes de alcantarillado y bombeo.
9684512902	NALCO. Manual tratamiento de agua.
9701000110	PERRY. Manual del ingeniero químico. 2 vols. 6.ª ed.
970101202X	PIZDEK. Manual del Control de Calidad en la ingeniería.
9701003926	ROSALER. Manual de mantenimiento industrial. 2 vols.
8448118308	TCHOBANOGLIOUS. Gestión integral de residuos sólidos.
9701012559	WADELL. Manual de la Construcción con Hormigón. 3.ª ed.

DICCIONARIOS

0070791627	COLLAZO. Diccionario encicl. de términos técnicos inglés/español-español/inglés. 3 vols.
970100695X	GIBLISCO. Electrónica. Diccionario enciclopédico.
9701006933	PARKER. Enciclopedia McGraw-Hill de la ciencia y la tecnología. 2 vols.
9684223358	WILLIAMS. Diccionario español/inglés-English/Spanish Dictionary. 2.ª ed.

BIOTRATAMIENTO DE RESIDUOS TÓXICOS Y PELIGROSOS

Selección, estimación, modificación
de microorganismos y aplicaciones

Morris A. Levin

Editor

Instituto de Biotecnología de Maryland
Universidad de Maryland
College Park, Maryland

Michael A. Gealt

Editor

Departamento de Biociencia de Biotecnología
Universidad de Drexel
Philadelphia (Pensylvania)

Traducción y revisión técnica:

IÑAKI TEJERO MONZÓN

Catedrático de Tecnologías del Medio Ambiente
Departamento de Agua y Medio Ambiente
E. T. S. Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos
Universidad de Cantabria

JUANJO AMIEVA DEL VAL

Profesor titular de Ingeniería Química
Departamento de Química, Escuela Superior de Marina Civil
Universidad de Cantabria

McGraw-Hill

MADRID • BUENOS AIRES • CARACAS • GUATEMALA • LISBOA • MÉXICO
NUEVA YORK • PANAMÁ • SAN JUAN • SANTAFÉ DE BOGOTÁ • SANTIAGO • SÃO PAULO
AUCKLAND • HAMBURGO • LONDRES • MILÁN • MONTREAL • NUEVA DELHI • PARÍS
SAN FRANCISCO • SIDNEY • SINGAPUR • ST. LOUIS • TOKIO • TORONTO

Contenido

Autores	vii
Prólogo	ix
Prólogo a la edición española	xi
<hr/>	
1. Visión general de las prácticas y del futuro del biotratamiento	1
2. Bioestimulación para mejorar la biorrecuperación microbiana.....	21
3. Principios y prácticas de biotratamiento utilizando microorganismos modificados	41
4. Biorreactores	67
5. Modelación de los procesos biológicos implicados en la depuración de los sustratos orgánicos peligrosos	117
6. Limitaciones de la legislación y política vigente: regulación de la biorrecuperación de residuos peligrosos	141
7. Biorrecuperación <i>in situ</i>: fundamentos y prácticas	169
8. Uso de microorganismos alterados para la biodegradación de materiales peligrosos en trabajos de campo	199
9. Biotratamiento aplicado a suelos contaminados con ftalatos: reconocimiento y superación de retos técnicos	211
10. Biorrecuperación anaerobia a escala real de suelos contaminados con dinoseb	221
11. Tratamiento biológico de aguas residuales industriales y peligrosas	249
12. Cuestiones reglamentarias y de eficacia en la biorrecuperación de los derrames de petróleo: experiencias con el derrame del <i>Exxon Valdez</i> en Alaska	237
13. Orientaciones futuras en la biorrecuperación	313
Índice	327

Sobre los editores

MORRIS LEVIN, Ph. D., es profesor en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Maryland. El instituto cuenta con el apoyo de una asociación de organizaciones académicas, industriales y gubernamentales. Es coautor de *Microbial Ecology* y *Risk Assessment in Genetic Engineering*, obras publicadas también por McGraw-Hill. El doctor Levin reside en Baltimore, Maryland.

MICHAEL A. GEALT, Ph. D., es profesor en el Departamento de Biociencia y Biotecnología y Director Asociado del Instituto de Estudios Ambientales de la Universidad de Drexel. Sus investigaciones más recientes han sido financiadas por organizaciones tanto industriales como gubernamentales, incluyendo la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. El doctor Gealt reside en Jenkinstown, Pennsylvania.

Autores

Piero M. Armenante Departamento de Ingeniería Química, y Ciencias Ambientales, Instituto de Tecnología de Nueva Jersey, Newark, New Jersey.

Ronald M. Atlas Departamento de Biología, Universidad de Louisville, Louisville, Kentucky.

Rita Colwell Instituto de Biotecnología de Maryland, Universidad de Maryland, Baltimore, Maryland.

D. L. Crawford Centro de Investigación para la Recuperación de los Residuos Peligrosos, Departamento de Bacteriología y Bioquímica, Universidad de Idaho, Moscow, Idaho.

R. L. Crawford Centro de Investigación para la Recuperación de los Residuos Peligrosos, Departamento de Bacteriología y Bioquímica, Universidad de Idaho, Moscow, Idaho.

B. D. Ensley Envirogen, Lawrenceville, New Jersey.

S. B. Funk Centro de Investigación para la Recuperación de los Residuos Peligrosos, Departamento de Bacteriología y Bioquímica, Universidad de Idaho, Moscow, Idaho.

Michael A. Gealt Departamento de Biociencia y Biotecnología, Universidad de Drexel, Philadelphia, Pennsylvania.

David E. Giamporcaro Jefe de Sección, Programa de Biotecnología, Oficina de Prevención de Contaminación y Tóxicos, Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, Washington, D. C.

R. H. Kaake Centro de Investigación para la Recuperación de los Residuos Peligrosos, Departamento de Bacteriología y Bioquímica, Universidad de Idaho, Moscow, Idaho.

A. Keith Kaufman División de Servicios de Biorrecuperación, RESNA Industries, Los Ángeles, California.

Cheryl C. Krueger División de Servicios de Biorrecuperación, RESNA Industries, Los Ángeles, California.

Morris A. Levin Instituto de Biotecnología de Maryland, Universidad de Maryland, College Park, Maryland.

Carol D. Litchfield Chester Environmental, Monroeville, Pennsylvania.

P. H. Pritchard Agencia de Protección Ambiental, Laboratorio de Investigación Ambiental, Sabine Island, Gulf Breeze, Florida.

Bruce E. Rittmann John Evens Profesor de Ingeniería Ambiental, Northwestern University, Evanston, Illinois.

D. J. Roberts Centro de Investigación para la Recuperación de los Residuos Peligrosos, Departamento de Bacteriología y Bioquímica, Universidad de Idaho, Moscow, Idaho.

Pablo B. Sáez Profesor Asociado de Ingeniería Ambiental, Universidad Pontificia Católica de Chile, Santiago, Chile.

Gregory D. Sayles Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, Laboratorio de Ingeniería para la Reducción de Riesgos, Cincinnati, Ohio.

Malcolm Shields Centro de Diagnósticos Medioambientales, Universidad de West Florida, Pensacola, Florida.

Makram T. Suidan Departamento de Ingeniería Civil y Medioambiental, Universidad de Cincinnati, Cincinnati, Ohio.

G. J. Zylstra Universidad Rutgers, New Brunswick, New Jersey.

Prólogo

Uno de los rasgos característicos de la sociedad moderna es la creciente emisión de productos químicos al medio ambiente. Existen dos fuentes principales para estas emisiones: los productos químicos creados para uso ambiental y el material residual.

Una de las características de los tiempos modernos es la gran producción de materiales sintéticos que son difíciles de degradar y/o son tóxicos para el ambiente. Con el fin de mejorar su rendimiento, los compuestos han sido diseñados específicamente para tener una larga vida útil y no reaccionar con los productos químicos ambientalmente más comunes. Estas mismas características evitan su degradación. Las estructuras compuestas resistentes al ataque químico, que por lo tanto consiguen una mayor longevidad y un mantenimiento eficaz de la estructura —características deseables—, son resistentes a las enzimas de la mayoría de los microbios. En algunos casos, p. ej., en los bifenilos policlorados (PCBs), estas características han sido las responsables, en parte, de su presencia continua en zonas donde su producción y uso se ha detenido.

Los procesos de fabricación poco eficaces también han dado lugar a escapes accidentales de productos y precursores tóxicos (a veces, altamente tóxicos). Incluso cuando la toxicidad esté documentada y haya finalizado la producción de un compuesto específico, o clase de compuestos, la propia naturaleza del material asegura que durante muchos años existirán problemas con su evacuación y destrucción.

Actualmente, las soluciones viables y permanentes para los problemas de evacuación son bastante limitadas. Durante muchos años, el entierro en vertederos de los residuos peligrosos ha sido un proceso razonablemente rentable. Sin embargo, han surgido problemas con algunos vertederos, ya que se han producido filtraciones a las aguas subterráneas. En los vertederos modernos, este problema ha sido aliviado, al menos temporalmente, mediante el uso de un sistema complejo de recubrimientos geosintéticos, así como de sistemas de drenaje y contención. Un problema más reciente asociado a los vertederos ha sido la rápida disminución del espacio disponible —especialmente en la zona Este de Estados Unidos, zona muy industrializada y poblada—. La separación de materiales tóxicos y su transporte hasta lugares más alejados supone unos importantes costes adicionales para su evacuación.

Aunque la incineración soluciona algunos de los problemas de los vertederos, especialmente el de almacenamiento, genera sus propios problemas. La incineración de residuos líquidos y sólidos convierte al menos parte del material en un

Prólogo a la edición española

Tradicionalmente, el tratamiento biológico se ha aplicado a aguas residuales industriales con altos contenidos en materia orgánica y sin problemas de toxicidad. Sin embargo, hoy día el tratamiento biológico puede ser una alternativa al tratamiento de residuos industriales tóxicos y peligrosos. Este libro expone las técnicas y métodos que han permitido que esto sea así. Aunque los conocimientos del libro son aplicables de forma general al problema planteado, se orientan de forma especial al más complejo tratamiento de suelos contaminados, describiendo y analizando todas las técnicas disponibles. El libro abarca aspectos de gran interés como son:

- El estudio de los diferentes tipos de tratamientos biológicos propuestos para residuos industriales peligrosos. Desde los tratamientos *in situ* de suelos contaminados, con construcción o no de un reactor, hasta los que necesitan una planta de tratamiento.
- La detallada explicación de las técnicas dedicadas a la mejora de los citados tratamientos. En este apartado podemos incluir desde los métodos complicados, como el uso de microorganismos alterados o sintetizados genéticamente, hasta métodos más simples, como la experiencia necesaria para los procesos de la bioestimulación y el bioaumentación.
- La aplicación de los descritos teóricamente, en los apartados anteriores, a casos prácticos y reales, como el tratamiento de suelos contaminados con ftalatos, con dinoseb (herbicida) o con petróleo (accidente del *Exxon Valdez*), o el tratamiento de aguas residuales: industrias peligrosas.
- Los aspectos legales y políticos, tanto en lo relativo a la gestión (contaminación, tratamiento y evacuación) de residuos, desarrollo de nuevas tecnologías, como del control de los nuevos métodos aplicados (liberación de microorganismos modificados). Aunque el libro trata ese tema a la luz de las leyes y normas de Estados Unidos de América (USA), esta visión es una referencia obligada por otros países.

Creemos que esta obra es una herramienta de gran utilidad para todos los que participamos en la gestión y el tratamiento de los residuos industriales, porque actualiza dicho campo incorporando los últimos avances y potencialidades del tratamiento biológico de los mismos. Teniendo en cuenta lo que queda por hacer

en el campo de la recuperación de suelos contaminados en los países de habla española, pensamos que este libro puede ser de gran ayuda para los técnicos locales.

Por último, tenemos que agradecer la colaboración de nuestros colegas del Departamento de Agua y Medio Ambiente, Juan Carlos Canteras Jordana y doña Luisa Pérez García, Profesores de Ecología, a los miembros del equipo de Ingeniería Ambiental de la Universidad de Cantabria, todos ellos Master en Ingeniería Ambiental, Inmaculada Lorda de los Ríos, Pedro Castillo de Castro, Juan José Osa Olaizola y Daniel Hernández Castillo. En el aspecto lingüístico, la colaboración de Christopher Tyas (licenciado en Geografía por la Universidad de Gales, Colegio de Swansea) y Carmen Santamaría (licenciada en Historia por la Universidad de Cantabria) ha sido inestimable.

Los traductores

Capítulo 1

VISIÓN GENERAL DEL BIOTRATAMIENTO Y SU FUTURO

Morris A. Levin

*Instituto de Biotecnología de Maryland
Universidad de Maryland
College Park, Maryland*

Michael A. Gealt

*Departamento de Biociencia y Biotecnología
Universidad de Drexel
Philadelphia, Pennsylvania*

El problema básico: la emisión de materiales peligrosos

Los materiales residuales emitidos directamente desde fuentes industriales y agrícolas son los causantes de una considerable contaminación del suelo y del agua en Estados Unidos. Existen en torno a 14.000 zonas industriales en este país que generan cerca de 265 toneladas de residuos peligrosos anualmente. Los tipos de residuos peligrosos encontrados en un vertedero, así como su cantidad y toxicidad, varían de forma importante. Un vertedero típico puede contener un material tan diverso como la mezcla de: conchas de ostras, cobre, pintura y productos asociados, y también, cajas con cianuro potásico, de arsénico, de caramelos y de galletas. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha lanzado un programa para el tratamiento de estos lugares, el Superfund Innovation Technology Evaluation Program (SITE), (Programa de Evaluación para la Tecnología Innovadora Superfondo), y en diversos países ya están en marcha otros programas.

Aunque la mayor parte de los esfuerzos en relación al biotratamiento comercial se han realizado en Estados Unidos⁶¹, en muchos lugares de Europa también se han logrado éxitos^{2,11,58,63}. Algunas grandes empresas, como Dow Chemical, están implicadas en la investigación dirigida hacia la mejora del proceso de biodegradación. Estos esfuerzos se realizan sin el uso de organismos modificados genéticamente, aunque las posibilidades de las cepas modificadas sugieren que en el futuro se lograrán unos mayores niveles de recuperación^{13,65}. Recientemente, Bhamidimarri et al.¹⁰ informaron de que más del 98 por ciento de unos lixiviados de vertedero que contenían una carga diaria de 1,6 kg de derivados fenólicos y de 0,5 kg de fenoles, se degradaron mediante un método semicontinuo utilizando una población mezclada de microorganismos del suelo.

Recientemente, un grupo de empresas más pequeñas han formado una asociación y han elaborado un compendio que describe lo realizado con éxito en el biotratamiento a escala mundial². William Reilly, cuando fue director de EPA, resaltó la importancia de la biorrecuperación para el tratamiento de los residuos peligrosos²⁹.

En muchos casos, los materiales tóxicos que necesitan una recuperación están presentes porque se utilizaron para solucionar otros problemas técnicos. Por ejemplo, el uso de bifenilos policlorados (PCBs) en los transformadores era una práctica común porque eliminaban el peligro de incendio de otros lubricantes. En ocasiones se producían emisiones durante la producción de los compuestos, o la construcción o evacuación de los transformadores. Esto de ninguna forma facilita la recuperación.

Lo que más atrae la atención de los medios de comunicación son los derrames y otros escapes accidentales. El derrame del *Exxon Valdez* es un buen ejemplo de las dificultades que surgen en el transporte de materiales peligrosos. Lo que a menudo se olvida es el más frecuente derrame de aceite, aunque en cantidades mucho más pequeñas, que se produce cada vez que se tira lastre desde un buque petrolero. Una situación similar se produce con los derrames no programados desde camiones o vagones de ferrocarril. Cuando se rompe un camión cisterna cargado con cresol, no es necesario excavar toneladas de suelo para prevenir la contaminación de las aguas subterráneas. Se puede aplicar una cepa apropiada de bacterias, con los nutrientes correctos, para degradar el material molesto². Aunque son dramáticos, estos escapes importantes también son esporádicos y, por lo tanto, pueden suponer un problema de recuperación menor que los escapes constantes no intencionados que acompañan al llenado o vaciado de una cisterna o de un tanque de un petrolero.

Mecanismos de recuperación

Existen diversos métodos, tanto biológicos como no biológicos, para la recuperación de zonas contaminadas. Cada uno presenta ventajas y desventajas, y, en ocasiones, lo más rápido y rentable es una combinación de sistemas. Para poder elegir la combinación adecuada de tecnologías, es necesario un examen completo del

lugar. La evaluación de la zona debe registrar los datos físicos y biológicos, incluyendo: hidrogeología, composición del suelo, caracterización de la población microbiana, y consideraciones de tipo climatológico, además de determinar el rango de contaminantes presente.

Tratamiento no biológico

Para eliminar la exposición a residuos peligrosos han sido eficaces diversos tratamientos no biológicos. Estos métodos físico-químicos incluyen: el almacenamiento a largo plazo, los vertederos, la incineración y el arrastre por aire. Aunque otras técnicas han demostrado su potencial para degradar a escala de laboratorio, la necesidad crucial de ampliar el sistema para recuperar cientos de lugares contaminados a un coste razonable ha hecho que los métodos no biológicos sean muy útiles.

El almacenamiento a largo plazo y el vertido presentan una serie de ventajas y desventajas similares. Como no se manipula el material tóxico, el coste suele ser mínimo, siempre y cuando se pueda conseguir un lugar razonablemente cercano para el almacenamiento o vertido. El mayor coste implicado es el de separación y transporte de los residuos peligrosos. Este coste puede llegar a ser excesivo si la distancia es muy grande. En la actualidad, la situación suele complicarse debido al rechazo del público respecto al desarrollo de instalaciones de almacenamiento a largo plazo. La posibilidad de que se den unas condiciones de mantenimiento insuficientes y de que se produzca una posible lixiviación al suelo o a las aguas subterráneas ha incrementado el nivel de inquietud pública. Junto con esta mayor inquietud por parte del público, ha surgido una legislación y regulación que afecta al diseño de contenedores y vertederos, y esto ha supuesto un aumento de los costes.

La incineración y el arrastre por aire tienen como ventaja su capacidad para hacer descender la cantidad presente de material tóxico. La incineración consume energía y también puede llevar a la producción de otros materiales tóxicos, p. ej., dioxinas, que requieren de una costosa depuración antes de poder salir a la atmósfera. El arrastre por aire provoca también la emisión al ambiente de pequeñas cantidades de compuestos tóxicos, y según el método utilizado, puede implicar la necesidad de transferencia de los materiales tóxicos al carbono activado, que a su vez necesitaría un tratamiento. En muchos casos es preferible, por consideraciones tanto económicas como de tiempo, la combinación de un tratamiento biológico con otro físico-químico. Los datos necesarios para adoptar este tipo de decisiones deberían ser recopilados durante la inspección inicial de la zona.

Tratamiento biológico

Para destoxificar los compuestos, otras tecnologías aprovechan la capacidad de los microorganismos. Mizrahi⁴¹ revisó los distintos métodos de tratamiento utilizados en los digestores de biogás, las tecnologías de digestión anaerobia, y los aspectos de gestión que dan lugar a una operación más eficaz en una planta de aguas residuales. Los primeros estudios recomendaron el uso de grava como me-

dio soporte en un filtro percolador. Los residuos tóxicos fueron retenidos por la grava, en muchos casos posibilitando su degradación mediante organismos autóctonos. Aunque en la práctica eran sencillos, estos filtros percoladores a menudo resultaron lentos a la hora de destoxificar. A este trabajo le siguió el desarrollo de unos digestores anaerobios más eficaces y, posteriormente, de unos digestores aerobios. La digestión aerobia supone algo tan sencillo como la adición de aire a la mezcla de digestión, de esta forma se estimula el crecimiento y la capacidad oxidativa de los microorganismos. Una de las primeras prácticas de la selección genética se basó en el descubrimiento de que un inóculo, procedente de las digestiones previas, aumentaba considerablemente el proceso de degradación. Las modificaciones realizadas en el proceso de degradación permitieron acortar el tiempo necesario, a veces hasta llegar a tan sólo 5-10 días.

Se han desarrollado muchos procedimientos diferentes para conseguir aumentar el contacto entre los microorganismos y determinados contaminantes específicos, con el fin de maximizar el rendimiento del proceso y minimizar los posibles riesgos. En la Tabla 1.1 (véase también Roberts et al., Capítulo 10) se describen algunos de los procedimientos y las cuestiones de seguridad asociados a cada uno de ellos. Existen procedimientos (p. ej., el tratamiento por aplicación al terreno) que presentan dificultades similares a las encontradas en el tratamiento no biológico; es decir, la posible lixiviación desde la zona de tratamiento. En el tratamiento biológico, los productos químicos no tratados, los productos de degradación intermedia y los propios microorganismos pueden escapar de la zona. No obstante, se debe puntualizar que el período de tiempo durante el cual pueden producirse los efectos adversos de los residuos o de los productos de desintegración es mucho más corto. El procedimiento de degradación microbiana se completa en un tiempo finito; el sistema de almacenamiento no presenta un límite. Los posibles efectos adversos que se producirían al añadir microorganismos se revisan antes de permi-

TABLA 1.1. Comparación de métodos de tratamiento

Tipo de tratamiento	Coste por metro cúbico (\$)	Tiempo necesario (meses)	Factores adicionales/gastos	Cuestiones de seguridad
Incineración	325-1.040	6-9	Energía	Contaminación atmosférica
Inertización	70-96	6-9	Transporte; control a largo plazo	Lixiviación
Vertedero	195-325	6-9	Control a largo plazo	Lixiviación
Biotratamiento	52-130	18-60	Tiempo dedicado	Metabolitos intermedios y polimerización

tir su uso inicial. Los microorganismos utilizados son los que normalmente ya están presentes (autóctonos).

Compuestos que pueden ser degradados biológicamente. Existen diversas opiniones en relación a si los microorganismos tienen límites en sus capacidades digestivas, o si bien son capaces de degradar cualquier compuesto que el hombre pueda producir⁶². Indudablemente, la verdad se sitúa entre estos dos puntos de vista extremos. No obstante, los microbios pueden degradar multitud de compuestos bajo condiciones distintas. Muchos compuestos sintéticos pueden también modificarse o transformarse mediante el uso de una bacteria, hongo, o de algún tipo de población microbiana trabajando en asociación⁵. Estos procesos varían desde la putrefacción de comida hasta la limpieza de derrames de petróleo en las playas costeras. En muchos casos estos procesos son beneficiosos y esenciales. Después de todo, gran parte del proceso cíclico, orgánico e inorgánico, necesario para el mantenimiento del ecosistema es consecuencia de la actividad microbiana²³.

Además de poder modificar o degradar un compuesto, el rendimiento tiene que ser alto. Se ha calculado que cada año 6.000 toneladas de azufre circulan entre los compuestos orgánicos e inorgánicos. Gran parte de los compuestos xenobióticos (sintéticos) emitidos también deben ser fácilmente digeridos por los microorganismos mediante modificaciones complejas de los caminos cíclicos naturales⁴³. Cada año en Estados Unidos se producen mucho más de 50 millones de toneladas de residuos peligrosos regulados a nivel federal¹⁷. Además de la producción nueva, existen muchos (las estimaciones llegan hasta el 50 por ciento) depósitos de almacenamiento de productos petrolíferos que tienen pérdidas. Entre los contaminantes químicos se pueden mencionar: tolueno, benceno, di-, tri-, y tetracloroetileno; y parationa (AATP). Las concentraciones pueden ser altas. Por ejemplo, se ha encontrado tricloroetileno (TCE) en concentraciones de 27 ppm en las aguas subterráneas⁵⁴.

Los cortos marcos temporales no permiten la evolución de sistemas microbianos capaces de tratar con facilidad y rápidamente todos los productos químicos xenobióticos^{30,56}. Muchos productos químicos xenobióticos son resistentes al ataque microbiano y/o son tóxicos para los microorganismos. Sin embargo, en zonas contaminadas con diversos compuestos xenobióticos se han aislado algunos microbios que pueden degradar muchos compuestos xenobióticos con diversa facilidad y velocidad. Abramowicz¹ demostró estas conclusiones en suelos contaminados con PCBs. Propuso la combinación de material genético con 26 cepas aisladas distintas para producir una sola bacteria útil. Las moléculas que se han podido biodegradar incluyen: cloruro de etileno⁵²; PCBs^{1,42,12}; gasolina y otros derivados del petróleo^{7,28}; compuestos con 2 y 3 grupos nitro, incluyendo herbicidas nitrogenados^{3,60} y trinitrotolueno²²; hidrocarburos policlorados, incluyendo: pentaclorofenol^{38,39,43}, tetracloroetileno (PCE), TCE, dicloroetileno (DCE), y cloruro de vinilo (VC)^{37,46,66,67,71}; tetracloroeteno¹⁹; creosota^{21,45}; y fluoranteno^{32,44}.

Organismos implicados. Son varios los organismos capaces de llevar a cabo el proceso de degradación. En algunos casos se han identificado y caracterizado, mientras que en otros ha sido extremadamente difícil cultivarlos e incluso aislar-

los. Uno de los organismos más estudiados ha sido el *Pseudomonas* G4^{47,48}. Esta bacteria es eficaz en la degradación del TCE. El organismo puede inducirse en ambientes más generales mediante un gran número de cosubstratos⁵⁹. Como puede degradar varios compuestos e inducirse a partir de diversos compuestos, el G4 puede ser de gran utilidad en el tratamiento de los residuos en muchas zonas donde exista una mezcla de productos tóxicos. Las modificaciones genéticas de esta bacteria deberían conseguir aumentar su potencial.

Las modificaciones genéticas han sido investigadas por Ensley y Zylstra (véase Capítulo 3). Se ha probado con modificaciones que incrementan el rango de capacidad de los microorganismos así como el nivel de degradación y estabilidad en condiciones de estrés ambiental. Aunque se han obtenido unos resultados excelentes en el laboratorio, los estudios a escala real todavía están en fase de desarrollo. Tal y como expone Giamporcaro (Capítulo 6), la visión reglamentaria todavía está desarrollándose, tanto para los organismos creados mediante las técnicas clásicas (p. ej., conjugación, transformación, mutagénesis) como para los creados mediante la biología molecular, que implica el uso de vectores o electroporación, y mutagénesis dirigida a un sitio. Giamporcaro trata también detalladamente desde una perspectiva reglamentaria los problemas específicos asociados al uso de microorganismos modificados.

Otros ejemplos de la utilidad de las especies de *Pseudomonas* incluyen las múltiples cepas que contienen el plásmido TOL, lo que permite la degradación del tolueno. La localización en el plásmido de los genes implicados en la degradación del tolueno ha aumentado la capacidad de delimitar los mecanismos que permiten un mejor tratamiento. El plásmido TOL se produce de forma natural, lo que sugiere que la capacidad de degradar los compuestos xenobióticos puede ser el resultado, en parte, de la interacción con moléculas generadas por los microorganismos autóctonos.

Entre las muchas otras cepas que han demostrado una capacidad degradadora se encuentra el «pseudomonad (cepa LB400)», que ha sido aislado y presenta actividad frente a los PCBs¹². Se ha demostrado que un aislado de *clostridium* puede transformar el tricloroetileno, triclorometano, y tetraclorometano²⁵. También se ha demostrado que el *Azotobacter* sp degrada los herbicidas dinitrofenoles⁶⁸.

Aunque se han podido encontrar organismos únicos que son capaces de degradar compuestos sencillos o grupos de compuestos, normalmente es necesario una asociación de bacterias para llevar a cabo la degradación de un flujo de residuos mezclados. En muchos casos, las asociaciones son incluso más eficaces para los residuos uniformes^{20,26,27,33}. Un mayor desarrollo de las asociaciones naturales o creadas puede dar lugar a mejoras en las prácticas de degradación. Como describen Roberts et al. (Capítulo 10), las prácticas selectivas sobre las poblaciones naturales fácilmente pueden desarrollar y reproducir un inóculo capaz de degradar el pesticida dinoseb.

En muchas ocasiones, los organismos indígenas requieren el aumento de algún nutriente para lograr una degradación relativamente rápida y completa de los residuos peligrosos introducidos^{4,24}. Los organismos en condiciones naturales generalmente presentan carencias en fósforo, nitrógeno y azufre. La adición de estos

compuestos estimula el crecimiento de la población natural, y quizás aún más importante, mejora su metabolismo, facilitando el transporte por las membranas celulares y, por lo tanto, el ataque metabólico. Puesto que la mayoría de las degradaciones del material tóxico se producen mediante cometabolismo, a veces puede ser necesario añadir una fuente de carbono.

Técnicas de biorrecuperación

Una vez elegidos los organismos, o adoptada la decisión de utilizar organismos indígenas, la siguiente tarea consiste en establecer cuál será la mejor técnica para la degradación. Los métodos varían tanto en sus requisitos biológicos e ingenieriles como en las consideraciones de seguridad (Tabla 1.2). El método elegido dependerá del lugar, del marco temporal, y de los recursos económicos disponibles.

El tratamiento por aplicación al terreno es probablemente el método más sencillo y común a la hora de tratar los residuos. Se realiza directamente *in situ* y sólo implica la adición de humedad y de los nutrientes necesarios para conseguir el crecimiento microbiano y favorecer el metabolismo de los contaminantes. Se pueden tratar grandes extensiones de suelo con un mínimo de transporte, normalmente utilizando una retroexcavadora; la aireación frecuentemente se realiza empleando la misma retroexcavadora. Sólo es posible un control ambiental mínimo de los parámetros físicos (pH, temperatura, etc.), y los productos de las reacciones microbianas en general se dispersan libremente. Este proceso puede ser acelerado mediante el reciclaje de parte del suelo empleado, creciendo, de esta forma, la población microbiana capaz de degradar unos residuos específicos. El tratamiento anaerobio es posible mediante la supersaturación del suelo contaminado con nutrientes, así disminuirá la cantidad de oxígeno disponible para las bacterias y hongos (véase Capítulo 10, por Roberts et al.). Se han utilizado recubrimientos para contener el proceso, pero éstos fallan, y su control es difícil.

Una metodología común es la separación del suelo o del agua contaminados, p. ej., aguas subterráneas, colocándolos en un reactor donde actúan los microorganismos. La construcción de un reactor en el que se mezclarán los residuos peligrosos y los microorganismos es más eficaz en términos de control, pero más costoso en términos globales de construcción y operación^{14,15}. En el reactor se puede optimizar la temperatura, el tiempo de contacto, los niveles de nutrientes y las concentraciones de residuos. La construcción óptima y la teoría de reactores son discutidas por Armanente (Capítulo 4), y por Sayles y Suidan (Capítulo 11). Por otra parte, este método reduce la dispersión de los microorganismos y de los productos de degradación, y permite una degradación más rápida. El uso de microorganismos inmovilizados o de biorreactores con película fija consigue con frecuencia un mayor rendimiento, además el efluente puede ser controlado para minimizar la salida de microorganismos al ambiente. Es posible reciclar el material tratado, de esta forma se consigue mejorar el rendimiento global del proceso de tratamiento. Una de las mayores ventajas es que los reactores se pueden fabricar con un tamaño que permita su transporte mediante un camión; esto posibilita el uso de un mismo

Tabla 1.2. Tipos de procesos de biotratamiento

Tipo	Principio	Observaciones	Cuestiones de seguridad
Tratamiento en lechос	Suelo mezclado con nutrientes <i>in situ</i>	Requiere recubrimiento para contener microorganismos y material	El recubrimiento y la cubierta presentan problemas de escapes y de envejecimiento; el control y el tratamiento pueden ser difíciles
Mezcla completa de suelo (depósito o laguna)	Suelo y aguas agitados juntos en reactor	No existe control de temperatura	Poco control del proceso de depuración; el efluente puede controlarse y tratarse
Recuperación subsuperficial	Agua, nutrientes y oxígeno (receptor de electrones) bombeados a través del suelo	Mayor crecimiento de toda la población autóctona. Aplicaciones principales: derrames de petróleo y gasolina	Contaminación orgánica de las aguas subterráneas debido a la movilización de los compuestos; ningún control sobre la dispersión de los microorganismos o los productos de degradación
Sistema de tratamiento de suelos	Procedimiento de lavado para solubilizar los contaminantes adsorbidos	Pretratamiento necesario para maximizar la eficacia	El efluente va al SBR; el suelo lavado se puede controlar antes de su resustitución
Reactor secuencial continuo (SBR)	Digestión microbiológica en suspensión líquida	Permite controlar las condiciones de la reacción	Emisión de microorganismos al ambiente; se puede controlar para microorganismos y contaminantes
Sistema de tratamiento acuoso	Microorganismos o enzimas inmovilizados en un sistema continuo	Requiere materia orgánica soluble	Ninguna emisión de microorganismos; el efluente se puede controlar y tratar
Biorreactor de película fija	Microorganismos/enzimas sobre un medio plástico en columna para maximizar el área superficial y el intercambio de nutrientes	Puede tratar bajas concentraciones de materia orgánica	Ninguna emisión de microorganismos; la recirculación de los contaminantes permite aumentar la eliminación y el control

reactor en diversos lugares, lo que sin duda provoca una reducción de costes. Con frecuencia es necesario un post-tratamiento antes del vertido de los residuos en los sistemas municipales. Los microorganismos modificados genéticamente son los más lógicos para su utilización en los reactores, debido a su mayor facilidad de retención, y porque el material contaminante puede ser pasado por un reactor que contenga la mezcla adecuada de contaminante-microbio y ser controlado en los niveles de nutrientes, pH y oxígeno. Se puede permitir la salida al ambiente cuando los niveles de contaminantes sean aceptables, y el efluente sea tratado para minimizar la salida de la población microbiana.

Algunas modificaciones en la tecnología de los reactores pueden mejorar la degradación. Por ejemplo, Pierce⁵² e Irvine³¹ discuten el uso de los Reactores Secuenciales Discontinuos (SBRs) para tratar los lixiviados. Los esfuerzos de Irvine se centraron en el lixiviado de un lugar industrial contaminado. Inicialmente, el lixiviado se colocó, durante un período de hasta 19 días, en unos depósitos de almacenamiento en contacto con «fango activado» procedente de una planta de aguas residuales, antes de ser filtrado a través de columnas de carbono activo granulado (CAG). A los reactores se les añadieron unos organismos específicos seleccionados. En uno de los casos⁶⁵, se aisló y cultivó una cepa única de *Pseudomonas putida*, que poseía una capacidad degradadora específica no encontrada en la cepa original, se adaptó a los SBRs y se añadió a la mezcla microbiana existente en el SBR. Los SBRs funcionaron como sistemas cerrados. Todo el material orgánico volátil fue adsorbido en el CAG y reciclado anualmente, además se controló la reducción de los compuestos. El proceso SBR mostró su mayor eficacia sobre el carbono orgánico total (COT) y el fenol, consiguiendo una reducción de más del 99 por ciento, partiendo de niveles de 10.575 y 1.553 mg/l, respectivamente. El lixiviado tratado en el SBR todavía necesitaba un tratamiento con CAG para cumplir los niveles legales de descarga. A pesar del carbono necesario para reducir el COT y el fenol, después del tratamiento mediante SBR, el coste se redujo en aproximadamente 30 dólares por metro cúbico de agua.

El compostaje es un proceso de tratamiento común en todas las comunidades agrícolas que sirve como método para convertir los residuos en enmiendas de suelo reutilizables. Básicamente, se trata de una conversión microbiana llevada a cabo bajo una serie de condiciones, que limitan los tipos de bacterias y hongos, y de esta forma, sus actividades desarrolladas⁶. Un compostaje óptimo requiere un riguroso control de la humedad (50-60 %) y de la temperatura. El perfil de temperatura de una pila de *compost* generalmente permite que los microorganismos puedan atacar sucesivamente unidades diferentes del residuo peligroso. También es muy importante la aireación, y con frecuencia se presta mucha atención al método de introducción del aire. Las pilas de *compost* pequeñas se ventilan normalmente mediante el volteo mecánico del material que está fermentándose. Forzando el aire a través de la pila de *compost* o succionándolo mediante un sistema de vacío, se consigue regular mejor la ventilación. Los residuos litorales contaminados con petróleo han sido tratados con éxito mediante un compostaje aireado³⁴.

Uno de los campos más interesantes de la biorrecuperación es el tratamiento *in situ* de los residuos peligrosos. Mediante el tratamiento no solamente *in situ*, sino

también sobre el mismo suelo o directamente en el agua, se consiguen importantes ahorros en términos de excavación, bombeo, transporte, etc. Sin embargo, también existirá una pérdida de control sobre los factores ambientales y los microorganismos que puedan interaccionar con el material residual. En cualquier caso, es necesario añadir nutrientes al suelo o al agua para conseguir una degradación suficiente. Con frecuencia, el oxígeno se introduce directamente o mediante la adición de H_2O_2 a los nutrientes. La necesidad de un cosustrato implica que la mayor parte de la degradación se realiza mediante cometabolismo o cooxidación. En ocasiones hay que añadir un análogo estructural (p. ej., anilina para la 3,4-dicloroanilina, o un bifenilo para los PCBs) con el fin de inducir las enzimas necesarias para la degradación. Esto es necesario incluso en los casos en los que existen suficientes nutrientes y oxígeno. La toxicidad de la sustancia inductora es una de las dificultades que pueden surgir cuando se utiliza esta técnica. En los Capítulos 2 (Atlas) y 7 (Litchfield) se pueden encontrar múltiples ejemplos de la biodegradación *in situ*.

La degradación *in situ* normalmente requiere un cometabolismo, ya que el compuesto que se encuentra degradándose sirve escasamente o de forma nula como fuente de carbono o energía⁶. El trabajo de Pfaender, Alexander⁵¹ y Sakazawa⁵⁷ ilustra el hecho de que cuando se implica al cometabolismo, a menudo, se desconoce la designación de la especie del/de los organismo(s) implicado(s), aunque en muchos casos se especifique el género. Cuando se utilizan asociaciones de microorganismos, se identifican los productos finales del metabolismo y, con frecuencia, no se especifica cada microorganismo⁴⁹. El proceso de degradación a menudo implica una asociación de microorganismos que incluye cepas del género *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, y *Flavobacterium*, sin una identificación a nivel de especie. Una compañía constató en un informe que en la degradación de un derrame específico de gasolina aparecían implicados hasta 32 microorganismos diferentes¹¹. Por lo general, cuanto más compleja sea la mezcla, más compleja será la asociación de microorganismos^{11,50}.

Es posible que sea necesario añadir más microorganismos *in situ*. Éstos normalmente serán microorganismos autóctonos, ya que éstos tienden a funcionar mejor (véase Capítulo 10). La investigación aún no ha concluido a la hora de determinar las relaciones entre la capacidad genética de la población microbiana total en un lugar determinado, y la expresión fenotípica de la biodegradación. El objetivo de las investigaciones consiste en desarrollar una población microbiana mejor capaz de reducir los residuos en un lugar específico, y, quizás, comercializar la asociación para que pueda ser usada en otros lugares con una contaminación similar. La investigación también identificará aquellas actividades que, una vez desarrolladas, puedan mejorar las capacidades degradadoras (véase Ref. 65 y Capítulo 8).

Evolución de la biodegradación

Las consideraciones prácticas a la hora de desarrollar un plan de recuperación o restauración incluyen:

Restricciones de tiempo

El tiempo que puede dedicarse a la recuperación frecuentemente es uno de los elementos a considerar cuando se eligen los procesos de tratamiento. En general, la biorrecuperación *in situ* puede ser un proceso bastante rápido, especialmente cuando se compara con otros que requieren mayores infraestructuras. Sin embargo, existen importantes diferencias de tiempo para las distintas metodologías de biodegradación. El uso de microorganismos seleccionados (o reciclados) puede acelerar los procesos, pasando de desarrollarse en meses a hacerlo en unas pocas semanas. No obstante, es posible que además existan diferentes tratamientos más rápidos para algunos xenobióticos.

Restricciones de coste

Las inversiones realizadas por las comunidades para la biorrecuperación llegarán a 10.000 millones de dólares en el año 2.000 y a 30.000 millones en la década siguiente⁵³. Esto supone la realización de procesos de limpieza mediante una mezcla de métodos físicos, químicos y biológicos. Actualmente, los métodos biológicos se emplean en un 15-20 por ciento de los casos. La Tabla 1.1 compara los costes de diversos métodos de tratamiento, y se basa en las cifras de coste publicadas^{11,40,55,58,61,64,70}. Esta comparación es problemática ya que es necesario tener en cuenta otras consideraciones además de la estimación directa de los gastos reales. El biotratamiento requiere menos energía, y es el único método que puede lograr la mineralización de los materiales residuales en productos inocuos. Sin embargo, el biotratamiento necesita más tiempo, y no siempre alcanza el nivel de limpieza requerido por la normativa federal o local. Esto lleva a la necesidad de un tratamiento adicional y, por lo tanto, a costes adicionales. Sin embargo, el biotratamiento también genera un volumen importante de residuos, lo que reduce de forma significativa el coste del tratamiento adicional.

Restricciones reglamentarias

El *Federal Register* (Registro Federal) describe la política del gobierno de Estados Unidos respecto a la reglamentación de los productos de biotecnología. Esta política se basa en las leyes existentes sobre seguridad laboral, medio ambiente, agricultura, procesamiento de comidas y producción de fármacos, y salud pública. Existen cuatro leyes relevantes que afectan a la biorrecuperación y que deben tenerse en cuenta para garantizar el cumplimiento de la normativa actual. Estas leyes son: el Acta para el Control de Sustancias Tóxicas (TSCA) (Toxic Substances Control Act); el Acta Global de Responsabilidad, Compensación y Respuesta Ambiental (CERCLA) (Comprehensive Environmental Response Compensation, and Liability Act); el Acta de Recuperación y Conservación de Recursos (RCRA) (Resource Conservation and Recovery Act); y el Acta Federal para las Plagas Agrícolas (FPPA) (Federal Plant Pest Act)^{8,36}. Todos estos estatutos se encuentran bajo la jurisdicción de la EPA (USA). La EPA ha anunciado su intención de in-

cluidos a los microbios en el TSCA, y ha manifestado que la definición de «producto químico» recogida en el TSCA incluye también a estos microorganismos. El RCRA exige que EPA defina a los residuos peligrosos y fije normas para su tratamiento, el CERCLA regula la gestión de los residuos. Todas estas normativas que definen los tipos de residuos y describen los procedimientos para su tratamiento son discutidas por Giamporcaro en el Capítulo 6.

Restricciones de lugar

La composición física del lugar donde se encuentran los materiales peligrosos repercutirá de una forma importante sobre la capacidad de los microorganismos para llevar a cabo la biorrecuperación. Es importante determinar la hidrogeología, la localización de las tuberías subterráneas, así como otros factores que puedan afectar a los nutrientes y oxígeno suministrados a las bacterias degradadoras. La empresa Keystone Environmental Resources empleó dos años en el estudio del suelo que se encontraba bajo una zona contaminada¹⁶. Durante este tiempo se definieron algunos aspectos físicos, como la hidrología del lugar, el tipo de suelo, las condiciones subsuperficiales y las características climatológicas, al mismo tiempo que se llevaban a cabo estudios de laboratorio para establecer las características de la flora microbiana y el impacto de los contaminantes sobre las mismas. En el Capítulo 7, escrito por Litchfield, se dan los detalles de los requisitos de lugar para una biorrecuperación *in situ*. Quizás las consideraciones más importantes sean: la naturaleza exacta de los contaminantes, la extensión de la contaminación, y determinar si la contaminación se localiza principalmente en la zona vadosa del suelo o ha llegado hasta las aguas subterráneas.

La localización de la zona contaminada afectará a las perspectivas de biorrecuperación en función de la temperatura, el pH y la disponibilidad de agua. En cuanto a la temperatura, incluso las variaciones estacionales afectarán a la capacidad degradadora de los microbios. Sin embargo, está claro que existen bacterias y hongos que pueden llevar a cabo la biorrecuperación hasta en las zonas climáticamente más adversas, incluso en Alaska existen bacterias suficientes como para realizar una biorrecuperación *in situ* (véase Capítulo 12). La temperatura afecta no solamente a la velocidad de la actividad enzimática, sino también a la biodisponibilidad, el transporte en las membranas celulares, etc. La acidez o alcalinidad del medio también influirán sobre la recuperación, afectando, por ejemplo, al crecimiento de los organismos y a la especie molecular de xenobióticos presente. Quizás lo más importante sea la disponibilidad de agua. Para la actividad biológica es imprescindible contar con un contenido de agua en el suelo.

En muchos casos los microorganismos autóctonos pueden degradar el material contaminante si se suministran los nutrientes, la humedad y los receptores de electrones adecuados. Los nutrientes implicados son: el nitrógeno, el fósforo y las sales minerales. El carbono raramente es el factor limitante en las subsuperficies contaminadas. Normalmente se añade oxígeno como receptor de electrones, aunque en ocasiones se añade nitrito como alternativa, tal como se hizo en el Valle del Rhin en Alemania⁶⁹. Puede añadirse también peróxido de oxígeno (H₂O₂) en lugar

de oxígeno. Además puede haber casos (véase Capítulo 10) en los que se desee una degradación anaerobia. Esto puede lograrse añadiendo nutrientes sin la adición de oxígeno.

Si el tratamiento va a llevarse a cabo *in situ*, antes de empezar el proyecto, deben establecerse los procedimientos de control, incluyendo los períodos, los puntos y la duración del muestreo. La elección de los compuestos sometidos a control dependerá de los requisitos reglamentarios, así como de los compuestos específicos implicados y sus productos de descomposición. EPA ha fijado unas normas de emisión, unos procedimientos de control y análisis estadísticos (Tabla 1.3). En el caso de Keystone Environmental Resources, se controló el contenido en cloruro como indicador de la mineralización, y se hicieron mediciones directas de la contaminación en tres pozos aguas arriba y otros tres aguas abajo. A las 12 semanas de tratamiento, se había eliminado en torno al 90 por ciento del contaminante. En otras aplicaciones de campo se ha observado una reducción del 98-99 por ciento en los niveles de tetracloruro de carbono, clorobenceno, y etilbenceno.

Normalmente, para degradar 3.785 l de hidrocarburo, serían necesarios 4.536 kg de oxígeno y 397 kg de nitrógeno amoniacal. Esto daría como resultado la producción de 3.175 kg de bacterias. El éxito que supone el aumento de nutrientes se demostró en los esfuerzos que se realizaron para limpiar la costa de Alaska después del derrame del *Exxon Valdez*¹⁸, y es tratado por Pritchard en el Capítulo 12.

Los problemas asociados a las variaciones de las condiciones ambientales incluyen la degradación parcial provocada por la presencia de metabolitos interme-

Tabla 1.3. Mediciones necesarias para controlar la eficacia del tratamiento

Parámetro	Valor aceptable
Carbono orgánico total (COT)	2,3-2,4 mg/l **
Órganohalogenados totales	297-353 mg/l
pH	5-10 ***
Concentración de:	
Ac. benzoico	<2,5-34 mg/l
Fenol	4,9-7,5 mg/l ****
Ác. clorobenzoico	
<i>orto</i>	<3,5 mg/l
<i>meta</i>	<5,0 mg/l
<i>para</i>	40-47 mg/l
Ácido Het *	279-246 mg/l

* Acido 1,4,5,6,7-hexacloro-biciclo-5-norboneno-2-3-anhidrido dicarboxílico.

** Contaminante prioritario de EPA (USA): nivel aceptable = 300 mg/l.

*** Contaminante prioritario de EPA (USA): nivel aceptable = 5-10.

**** Contaminante prioritario de EPA (USA): nivel aceptable = 1 mg/l.

dios. Por ejemplo, en el proceso para la degradación del PCE, conocido cancerígeno en animales, se puede producir una acumulación de VC, que también es un cancerígeno humano^{9,35}. McCall et al. (1981) registraron que durante la degradación del PCE se encontraron concentraciones de 2,4,5-triclorofenol y 2,4,5-tricloroanisol en el suelo. Vira y Fogel proponen una combinación de tratamientos anaerobios y aerobios, con la adición de nutrientes (incluyendo oxígeno y metano), para lograr un control sobre la degradación en zonas con valor ecológico.

Consideraciones técnicas en la biorrecuperación

Los problemas técnicos relacionados a la interacción biológica con los residuos peligrosos a menudo están en función de la naturaleza del producto final. Un ejemplo común es el incremento de VC que con frecuencia acompaña a la degradación del TCE. Como el VC es mucho más tóxico que el TCE, lo mejor sería no hacer nada en vez de «recuperar» el problema convirtiéndolo en otro más grave.

Los microorganismos se han utilizado también para inducir la polimerización de los residuos peligrosos. Los polímeros se degradarán progresivamente, dando lugar a un posible retraso de la emisión de la sustancia peligrosa, no a su prevención. Éste puede ser el caso del almacenamiento *in situ*, en vez de dar lugar a una verdadera recuperación. Otro tipo de problema común es la producción de sustancias intermedias más tóxicas si el material no se encuentra completamente mineralizado. Cuando se produce una biotransformación, se debe determinar la toxicidad de los nuevos productos (o de las sustancias intermedias que puedan aparecer en el proceso hacia la completa mineralización). La aparición de estos compuestos transformados es más probable cuando se trata de PCBs mayores del 1.248, hidrocarburos policlorados con anillos que contengan más de cinco carbonos, y residuos mezclados que contengan radioisótopos.

Existen varios factores que deben considerarse cuando se desarrolla una propuesta para el uso de la biodegradación. De una importancia inmediata es la presencia o ausencia de una población bacteriana en el lugar, capaz de degradar el residuo peligroso. Aunque existen algunos materiales residuales que resisten (al menos a efectos prácticos) la degradación microbiana, en general se pueden obtener organismos capaces de atacar a la mayoría de los residuos. Puede ser necesario potenciar a los organismos en términos de densidad celular o actividad metabólica. Es posible que sea preciso un tiempo y esfuerzo (gasto) para desarrollar cepas adaptadas a un lugar en particular; el lugar puede requerir una serie de modificaciones para maximizar el potencial degradativo de los microorganismos; y los costes asociados a estos procesos es posible que superen los disponibles para el proyecto. Esto es especialmente cierto cuando las modificaciones necesarias entran en el campo de la ingeniería genética, que es capaz de lograr grandes mejoras en la capacidad degradadora, pero que, en general, emplea mucho tiempo ya que implica una amplia investigación. Otra consideración a tener en cuenta es la necesidad de un cosustrato u otra sustancia inductora (véanse los Capítulos 2, por Atlas, y 3, por Ensley y Zylstra, para una información más amplia) para mejorar el metabolis-

mo de un residuo específico. Si se trata de una sustancia demasiado costosa o tóxica, quizás no sea factible utilizarla, especialmente si las metodologías propuestas son el tratamiento *in situ* o el tratamiento terrestre.

Consideraciones de escala

Los pasos necesarios para la implantación de un programa de biotratamiento comienzan por las determinaciones de factibilidad (es decir, ¿se puede hacer?), y finalizan con las cuestiones de ingeniería y economía (es decir, ¿cómo puede hacerse a la escala necesaria en un lugar concreto con un coste razonable?). El proyecto Keystone citado anteriormente es un ejemplo de actividades a escala. Wick y Pierce⁶⁹ han descrito una aproximación integral al desarrollo e implantación de la biorrecuperación, esta aproximación implica: un examen detallado del lugar, una estimación de la cantidad y del tipo de material que se va a degradar, una demostración a gran escala y un análisis del coste del proceso, una consideración de las cuestiones reglamentarias (es decir, ¿se permitirá el uso de microorganismos —modificados o naturales—?, ¿cuáles son los límites reglamentarios impuestos por las autoridades competentes para los productos primarios y finales?), una estimación del tiempo necesario para completar el proceso de recuperación, y una evaluación de los restantes procedimientos que puedan combinarse con el biotratamiento para acelerar la limpieza y rebajar los costes. Para estos autores, el examen detallado de todos estos factores es esencial si se desea conseguir el éxito total de un proyecto de biorrecuperación.

Por lo general, el uso de tratamientos biológicos permite llevar a cabo un proceso de tratamiento rentable que puede hacer descender el nivel de materiales tóxicos por debajo de los niveles máximos legales. Aunque, ocasionalmente, el proceso puede emplear más tiempo que los procesos abióticos como, por ejemplo, la incineración, en general consigue una mineralización completa, con lo que disminuyen las posibilidades de exposición de las poblaciones humanas a los residuos posiblemente tóxicos o cancerígenos.

Referencias bibliográficas

1. Abramowicz, D. A. 1989. Biodegradation of PCB contaminated soil using recombinant bacteria. Proc. A&MA/EPA International Symp. Haz. Waste Treatment. Cincinnati, OH.
2. Applied Biotreatment Association. 1989. Compendium of Biotreatment Applications. ABTA, Washington, D.C.
3. Adrian, N. R., and J. M. Suflita. 1990. Reductive dehalogenation of a nitrogen heterocyclic herbicide in anoxic aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:292-294.
4. Aggarwal, P. K., J. L. Means, and R. E. Hincee. 1991. Formulation of nutrient solutions for in situ biodegradation, pp. 51-66. In R. E. Hincee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston.

5. Alexander, M., 1991. Research needs in bioremediation. *Environ. Sci Technol.* 25:1972-1973.
6. Atlas, R. M., and R. Bartha. 1973. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environ. Sci. Technol.* 7:538-541.
7. Atlas, R. M., and M. C. Atlas. 1991. Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. *Curr. Opinion Biotechnol.* 2:440-443.
8. Bakst, J. S. 1990. Impact of present and future regulations on bioremediation. *J. Ind. Microbiol.* 8:13-22.
9. Barrio Bell, R. H., and A. H. Hoffman. 1991. Gasoline spill in fractured bedrock addressed with in situ bioremediation, pp. 437-443. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *In Situ Bioreclamation. Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation.* Butterworth-Heinemann, Boston.
10. Bhamidimarri, S. M. R., D. Catt, and C. Mercer. 1990. Semi-continuous biotreatment of a landfill leachate containing phenoxy herbicide chemical. CHEMECA 90. Processing Pacific Resources. 18th Australasian Chemical Engineering Conference, Auckland, New Zealand, Vol. II, pp. 1039-1044.
11. Bluestone, M. 1986. Microbes to the rescue. *Chem. Week*, Oct. 29, 1986, pp. 34-40.
12. Bopp, L. H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* 1:23-29.
13. Bourquin, A. W. 1990. Bioremediation of hazardous waste. *Biofutur* 93:24-37.
14. Brauer, H. 1987. Development and efficiency of a new generation of bioreactors. Part 1. *Bioproc. Eng.* 2:149-159.
15. Brauer, H. 1988. Development and efficiency of a new generation of bioreactors. Part 2, Description of new bioreactors. *Bioproc. Eng.* 3:11-21.
16. Campbell, J. R., J. K. Fu, and R. O'Toole. 1989. Biodegradation of PCP contaminated soils using in situ subsurface reclamation. 2nd National Conference on Biotreatment; Proceedings, pp. 17-29. Hazardous Materials Control Research Institute, Washington, D.C.
17. Chiras, D. D. 1988. *Environmental Science: A Framework for Decision Making*, 2nd ed., Benjamin Cummings, Reading, MA.
18. Crawford, M. 1990. Bacteria effective in Alaska cleanup. *Science* 247:1537.
19. DiStepheno, T. D., J. M. Gossett, and S. H. Zinder. 1991. Reduction dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethene by anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2287-2292.
20. Dolfing, J., and J. M. Tiedje, 1987. Growth yield increase linked to reductive dechlorination in a defined 3-chlorobenzoate degrading methanogenic coculture. *Arch. Microbiol.* 149:102-105.
21. Evangelista, R. A. Treatment of phenol and cresol contaminated soil. *J. Haz. Mat.* (Amsterdam) v25:343-360.
22. Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust. 1990. Biodegradation of TNT (2,4,5-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1666-1671.
23. Fliermans C. B., and T. D. Brock. 1972. Ecology of sulfur oxidizing bacteria in hot acid soils. *J. Bacteriol.* 111:343-350.
24. Floodgate, G. D, 1979. Nutrient limitation, pp. 107-119. In A. W. Bourquin and P. H. Pritchard (eds.), *Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments.* EPA-660/9-012. Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, FL.
25. Galli, R., and P. L. McCarty. 1989. Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:837-844.

26. Genthner, B. R. S., W. A. Price, and P. H. Pritchard. 1989a. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1466-1471.
27. Genthner, B. R. S., W. A. Price, and P. H. Pritchard 1989b. Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1472-1476.
28. Hoeppe, R. E., R. E. Hincee, and M. F. Arthur. 1991. Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons. *J. Ind. Microbiol.* 8:141-146.
29. Hoyle, R. 1991. EPA moves on bioremediation. *Biotechnology* 9:10-34.
30. Hutzinger, O., and W. Vertkamp. 1981. Xenobiotic chemicals with pollution potential, pp. 3-45. In *Microbial Degradation of Xenobiotic and Recalcitrant Compounds*, T. Leisenger, A. M. Cook, R. Hutter, and J. Neusch (eds.). Academic Press, London.
31. Irvine R. L., S. A. Sojka, and J. F. Colaruotolo. 1982. Treating landfill by pure strain inoculations of SBR's, pp. 96-107. In *Impact of Applied Genetics in Pollution Control*, C. F. Kulpa, R. L. Irvine, and S. J. Sojka (eds.), University of Notre Dame, Notre Dame, IN.
32. Kelley, I., and C. E. Cerniglia. 1991. The metabolism of fluoranthene by a species of *Mycobacterium*. *J. Ind. Microbiol.* 7:19-26.
33. Kröckel, L., and D. D. Focht. 1987. Construction of chlorobenzene utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2470-2475.
34. Labrie, P., and B. Cyr, 1990. Biological remediation of shoreline oily waste from marine spills, pp. 339-387. In *Proceedings of the Thirteenth Annual Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar*. Environment Canada, Ottawa, Canada.
35. Lage et al. 1986. Lee, M. D., and R. L. Raymond, Sr. 1991. Case history of the application of hydrogen peroxide as an oxygen source for in situ bioreclamation, pp. 429-437. In R. E. Hincee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston.
36. Levin, M. A. 1992. *J. of Clear Technol. and Environ. Sci.* V2.1 31-39. Impact of regulations on oil spill clean up: The Alaska story. In press.
37. Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lindstrom, R. L. Tyndall, and P. J. Gilmer. 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:951-956.
38. Mahaffey, W. R., and R. A. Sanford. 1991. Bioremediation of PCP-contaminated soil: Bench to full-scale implementation. *Remediation* (Summer):305-323.
39. McCormick, D. 1985. One bug's meat. *Bio / Technology* 3:429-435.
40. Mikesell, M. D., and S. A. Boyd. 1988. Enhancement of pentachlorophenol degradation in soil through induced anaerobiosis and bioaugmentation with anaerobic sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 22:1411-1414.
41. Mizrhahi, A. 1989. Biological waste treatment. *Adv. Biotechnol. Proc.* 1:1-310.
42. Mondello, F. J. 1989. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* 171:1725-1731.
43. Morgan P., and R. J. Watkinson. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* V8.4:305-333.
44. Mueller, J. G., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard. 1989. Action of a fluorantheneutilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3085-3090.

45. Mueller, J. G., D. P. Middaugh, S. E. Lantz, and P. J. Chapman. 1991. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: Chemical and biological assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1277-1285.
46. Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, W. R. McHaffey, and P. H. Pritchard. 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:949-954.
47. Nelson, M. J., J. V. Kinsella, and T. Montoya. 1990. In situ biodegradation of TCE contaminated groundwater. *Environ. Progr.* 9:190-196.
48. Nelson, M. J. K., and A. W. Bourquin. U.S. Patent 4,925,802. Ecova Corp., Redmond, WA.
49. Neilson, A. H., A. S. Allard, C. Lindgrin, and M. Remberger. 1987. Transformations of chloroguaiacols, chloroveratroles, and chlorochatecols by stable consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2511-2519.
50. Olson, B. H. 1991. Tracking and using genes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 25:(4)604-610.
51. Pfaender, F. K., and M. Alexander. 1972. Extensive degradation of DDT in vitro and DDT metabolism by natural communities. *J. Agric. Food Chem.* 20:842-846.
52. Pierce, G. E. 1982. Diversity of microbial degradation and its implications in genetic engineering, pp. 20-25. In *Impact of Applied Genetics in Pollution Control*, Kulpa, C. F., R. L. Irvine, and S. J. Sojka (eds.), University of Notre Dame, Notre Dame, IN.
53. Porta, Augusto. 1991. A review of European bioreclamation practice. *Biotreatment News*, 1:(9)6-8.
54. ReVelle, P., and C. ReVelle. 1988. *The Environment, Issues and Choices for Society*, 3rd ed. Jones and Bartlett, Boston.
55. Risel, H. L., Boston, T. M., and Schmidt, C. J. 1984. *Costs of Remedial Response Actions at Uncontrolled Hazardous Waste Sites*. Noyes, Park Ridge, NJ.
56. Rochkind-Dubinsky, M. L., J. W. Blackburn, and G. S. Sayler, 1986. *Microbial Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds*. EPA/600/2-86/090, Washington, D.C.
57. Sakazawa, C., M. Shima, Y. Taniguchi, and N. Kato. 1981. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:261-267.
58. Savage, P. 1987. Bacteria pass a Houston cleanup test. *Chem. Week*, Nov. 11, 1987, pp. 55-56.
59. Shields, M. 1991. Treatment of TCE and degradation products using *Pseudomonas cepacia*. EPA Symposium on Bioremediation of Hazardous Wastes, Apr. 16-18, McClean, VA.
60. Spanggord, R. J., J. C. Spain, S. F. Nishino, and K. E. Mortelmans. 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3200-3205.
61. Stapps, J. J. 1988. Developments in in situ bioremediation of contaminated soil and groundwater in the Netherlands, pp. 379-390. In Z. Filip (ed.), *Biotechnologische In situ-Sanierung*. Fischer Verlag, Stuttgart/New York.
62. Sterritt, R. M. and J. N. Lester 1988. *Microbiology for Environmental and Public Health Engineers*. E. F. and W. Spon LTD, London and New York, 4-13.
63. Stone, Michael. 1984. Superbugs devour poisonous wastes. *Eur. Chem. News Chemicalscope*, November, 36-37.
64. Thayer, A. M. 1991. Bioremediation: Innovative technology for cleaning up hazardous waste. *Chem. Eng. News* 69:23-25.
65. Timmis, K. N., F. Rojo, and R. J. Ramos. 1988. Prospects for laboratory engineering

- of bacteria to degrade pollutants. In *Environmental Biotechnology: Reducing Risks from Environmental Chemicals through Biotechnology*, G. S. Omenn (ed.), Plenum Press, New York.
66. Uchiyama, H., T. Nakajima, and O. Yagi. 1989. Aerobic degradation of trichloroethylene at high concentration by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1019-1024.
 67. Vogel, T. M., and P. L. McCarty, 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1080-1083.
 68. Wallnoefer, P. R., W. Ziegler, G. Engelhardt, and H. Rothmeier. 1978. Transformation of dinitrophenol herbicides by *Azotobacter* sp. *Chemosphere* 7:967-972.
 69. Werner, P. 1985. A new way for the decontamination of polluted aquifers by biodegradation. *Water Supply* 3:41-47.
 70. Wick, C. B., and Pierce, G. E. 1990. An integrated approach to development and implementation of biodegradation systems for treatment of hazardous organic wastes. *Dev. Ind. Microbiol.* 31:81-93. McCall, P., S. Urona, and S. Kelly, 1981. Fate of uniformly carbon-14 ring labelled 2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid, *J. of Agricul. and Food Chem.* 29:100-107.
 71. Wilson, J. T., and B. H. Wilson, 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:242-243.

Capítulo 2

BIOESTIMULACIÓN PARA MEJORAR LA BIORRECUPERACIÓN MICROBIANA

Ronald M. Atlas

*Departamento de Biología
Universidad de Louisville
Louisville, Kentucky*

Las dos aproximaciones principales a la biorrecuperación de los residuos peligrosos petrolíferos y de los contaminantes ambientales son: la inoculación microbiana (*seeding*) y la bioestimulación de las actividades microbianas naturales. En la mayoría de los casos, la *bioestimulación* consiste en una modificación ambiental capaz de suprimir algún factor limitante que está restringiendo la velocidad del crecimiento microbiano y el metabolismo de la sustancia contaminante. Para que esta aproximación funcione, el contaminante no debe ser *recalcitrante*, es decir, los microorganismos deben tener la capacidad genética y fisiológica suficiente como para degradar la sustancia. Los factores que generalmente se controlan para estimular las actividades biodegradadoras mediante bioestimulación son: las concentraciones de nutrientes —normalmente nitrógeno y fósforo—, la concentración de oxígeno molecular, el potencial redox, y los niveles de humedad. Además, pueden aportarse sustancias como los sustratos para apoyar el crecimiento.

El uso potencial de la bioestimulación para la biorrecuperación de los residuos peligrosos y petrolíferos, y de otros contaminantes, es una aplicación que surge de los estudios básicos sobre el metabolismo microbiano y la ecología. Los estudios de los años 50 se dirigieron a los procesos del metabolismo microbiano de hidro-

carburos, con el fin de desarrollar biorreactores con células productoras de proteínas específicas que utilicen sustratos basados en el petróleo. Durante esta década se sentaron las bases del conocimiento del metabolismo de los hidrocarburos. Estos estudios se ampliaron al metabolismo de los hidrocarburos clorados, muchos de los cuales se utilizan como pesticidas o, de otra forma, acaban como contaminantes ambientales persistentes y/o tóxicos. Estos estudios fisiológicos sobre el metabolismo microbiano fueron completados en los años 60 con un examen de los factores ecológicos que controlan las distribuciones y actividades de los microorganismos en el medio ambiente. Algunos de estos estudios tenían como objetivo determinar los factores que controlan las velocidades de degradación microbiana de los contaminantes ambientales. Durante este período, se constató que los microorganismos tenían limitaciones y que, en ocasiones, no degradaban los residuos y contaminantes a unas velocidades lo suficientemente rápidas como para impedir una serie de impactos ambientales adversos. Se puso de manifiesto entonces la fiabilidad de los microorganismos, especialmente en términos de capacidad para degradar los xenobióticos y mostrar una rápida actividad degradadora en cualquier condición.

Aunque la bioestimulación no pudiese hacer mucho para superar las limitaciones de la evolución microbiana a la hora de desarrollar las vías de degradación enzimática, sí podía superar las limitaciones impuestas a la degradación microbiana por las restricciones ambientales. Las condiciones se podían optimizar en biorreactores, como ya se había hecho durante décadas en los fermentadores industriales e instalaciones de tratamiento de aguas y otros residuos, para conseguir la degradación microbiana de los residuos y contaminantes. También se podían diseñar tratamientos *in situ* para superar los factores que limitaban las actividades microbianas degradadoras en la naturaleza.

Cosustratos

El uso de microorganismos en la biorrecuperación depende de la capacidad de las cepas microbianas concretas para degradar contaminantes en compuestos menos tóxicos, que no causen daños ambientales o tengan efectos adversos sobre la salud humana. Para lograr esto, los microorganismos generalmente tienen que desarrollarse sobre la sustancia residual o contaminante. Los microorganismos consiguen energía y/o nutrientes para la formación de nuevas células como consecuencia del metabolismo catabólico de los sustratos que apoyan la vida. Sin embargo, en algunos casos, los microorganismos son incapaces de metabolizar una sustancia como fuente única de carbono y energía, pero pueden transformar dicha sustancia si se les aporta un sustrato de crecimiento alternativo, llamado *cosustrato*. Este fenómeno es conocido como *cometabolismo*, *cooxidación*, o *cotransformación*.

Desde un punto de vista formal, el *cometabolismo* describe el fenómeno que tiene lugar cuando un microorganismo transforma un compuesto, sin embargo, el organismo no puede crecer a partir del compuesto, y no obtiene energía, carbono u otro nutriente de la transformación. Normalmente, los productos del cometabolis-

mo son metabolitos parcialmente oxidados y/o deshalogenados. Si se aportan los cosustratos necesarios para apoyar el crecimiento, los microorganismos pueden transformar, gratuitamente y de forma simultánea, los residuos y contaminantes que por sí solos no podrían soportar el crecimiento microbiano. La adición de cosustratos, por lo tanto, puede ser utilizada para soportar la degradación cometabólica de algunos residuos y contaminantes ambientales.

El uso de microorganismos cometabolizantes es prometedor para la biodegradación de algunos residuos químicos, suponiendo que puedan encontrarse los cosustratos apropiados y puedan ser añadidos de forma rentable en las zonas donde tenga lugar la degradación de los residuos o contaminantes. Si un compuesto organoclorado xenobiótico no soporta el crecimiento microbiano, el microorganismo puede ser enriquecido con un análogo estructural clorado o menos clorado. Si el organismo posee enzimas en un espectro lo suficientemente amplio, podrá cometabolizar el producto químico xenobiótico aunque no pueda crecer a partir de él. Es razonable pensar que un suelo contaminado con un compuesto organoclorado recalcitrante pueda ser destoxificado si se aporta un análogo estructural biodegradable. De hecho, esto quedó demostrado en el caso de los bifenilos policlorados (PCBs) y la 3,4-dicloroanilina. En el primer caso, el bifenilo y, en el segundo, la anilina, fueron utilizados como sustratos estimulantes (You y Bartha, 1982; Brunner et al., 1985). La desaparición de los xenobióticos se aceleró mediante este método en un orden de magnitud o más. La degradación del DDT (*n*-[diclorodifenil-tricloroetano]) fue observada por vez primera utilizando cultivos enriquecidos con un cosustrato bifenilo.

Como las bacterias metanotróficas, mediante su producción de la enzima metano monooxigenasa (MMO), son capaces de degradar el tricloroetileno (TCE), dicloroetileno (DCE) y cloruro de vinilo mediante cometabolismo (Fogel et al., 1986), varios investigadores han considerado el uso de las bacterias metano-oxidantes para la biorrecuperación de lugares contaminados con estos compuestos halogenados. La idea consiste en lograr un enriquecimiento para obtener metanotrofos mediante el suministro de metano en forma de gas natural u otro sustrato, por ejemplo, acetato. Se ha demostrado que existe la posibilidad de conseguir una degradación aerobia amplia del TCE y de otros compuestos de C₂ halogenados mediante una asociación microbiana que utilice metano (Fogel et al., 1986; Moore et al., 1986; Little et al., 1988).

La baja especificidad de la enzima metano monooxigenasa permite la conversión del TCE en TCE epóxido, que posteriormente se hidroliza de forma espontánea en productos útiles para los microorganismos. El *Methylococcus capsulatus* convirtió el cloro- y el bromometano, consiguiendo transformar el dicloro metanol en CO y el triclorometano en CO₂ mientras se desarrollaba sobre metano (Dalton y Stirling, 1982). La degradación cometabólica del TCE mediante bacterias que utilizan metano ha sido documentada en varios estudios (Little et al., 1988; Palumbo et al., 1991; Uchiyama et al., 1989; Vogel y McCarty, 1985; Wilson y Wilson, 1983).

McCarty et al. (1991) descubrieron que podían estimular las poblaciones metanogénicas autóctonas. Ellos desarrollaron un tratamiento modélico de biorrecuperación *in situ* que requería 5.200 kg de metano y 19.200 kg de oxígeno para

convertir 1.375 g de hidrocarburos clorados, en un acuífero de 480.000 m³ con una carga contaminante de 1.617 kg de compuestos halogenados. Palumbo et al. (1991) constataron, sin embargo, que la presencia de perclorometileno (PCE) inhibía los microorganismos metanotrofos, lo que sugería la necesidad de una separación anaerobia del PCE antes de estimular a los microorganismos metanotrofos para que éstos separasen el TCE. Las bacterias metanotróficas son prometedoras en la biorrecuperación de acuíferos contaminados con halocarburos.

Además de las bacterias metano-oxidantes, los metanotrofos anaerobios son candidatos para las transformaciones cometabólicas de los residuos halogenados y contaminantes ambientales. Algunos microorganismos anaerobios llevan a cabo la deshalogenación reductora, produciendo sustancias que pueden ser degradadas más fácilmente por otros microorganismos. Se ha demostrado que es posible la degradación del tetracloroetileno mediante una asociación de bacterias metanogénicas, éstas crecerían sobre acetato en un reactor anaerobio (Vogel y McCarty, 1985; Galli y McCarty, 1989). Los pesticidas clorados, incluyendo al DDT, están sujetos a una deshalogenación reductora, es decir, a la separación del átomo de cloro por microorganismos anaerobios (Genthner et al., 1989a, 1989b). Por ejemplo, se ha atacado un herbicida nitrógeno-heterocíclico mediante deshalogenación reductora (Adrian y Suflita, 1990). Los clorobenzoatos y clorobenzenos también son degradados utilizando este mecanismo (Dolfing y Tiedje, 1987; Fathepure et al., 1988; Stevens y Tiedje, 1988; Stevens et al., 1988; Linkfield et al., 1989; Mohn y Tiedje, 1990a, 1990b).

Pfaender y Alexander (1972) tuvieron éxito al demostrar la mineralización *in vitro* del anillo bencénico del DDT mediante la utilización secuencial de extractos libres de células de una bacteria oxidante de hidrógeno, de células enteras de *Arthrobacter*, la adición de cosustratos, y regímenes sucesivos de condiciones anaerobias y aerobias alternantes. Sin embargo, llegaron a la conclusión de que la mineralización bioquímica del DDT en el ambiente, o no se produce, o se produce muy lentamente. Aparte de ser energéticamente no favorable en los pasos de de-cloración, no se encontró ninguna explicación satisfactoria para este hecho.

La degradación de los PCBs normalmente es por cometabolismo y aumenta con la adición de compuestos análogos menos clorados, tales como el diclorobifenilo (Adriaens et al., 1989; Brunner et al., 1985; Novick y Alexander, 1985). Semprini et al. (1991) descubrieron que los lugares contaminados con tetracloruro de carbono, tricloroetano y freón podían biorrecuperarse estimulando las poblaciones desnitrificadoras autóctonas mediante la adición de acetato. Se demostró la posibilidad de biodegradar el tetracloruro de carbono en suelos contaminados utilizando el cometabolismo, cuando la bioestimulación es llevada a cabo utilizando acetato en presencia de sulfatos, y nitratos en ausencia de oxígeno.

Oxígeno complementario

El crecimiento de microorganismos y el desarrollo de sus actividades metabólicas específicas dependen de la disponibilidad de oxígeno molecular y del potencial

redox. Algunos procesos tienen lugar solamente bajo condiciones aerobias, otros en cambio son estrictamente anaerobios. Los pasos iniciales en la biodegradación de hidrocarburos, al menos en la realizada por la mayoría de las bacterias y hongos, implican, por ejemplo, la oxidación del sustrato mediante oxigenación (ganancia de oxígeno), para lo cual se necesita oxígeno molecular (Atlas, 1984). Los hidrocarburos con contaminantes abundantes aparecen en los ambientes contaminados por productos para el tratamiento de la madera (la creosota contiene altas concentraciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos), por derrames de petróleo (el petróleo contiene una gran diversidad de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos), y por las fugas de los depósitos subterráneos de almacenamiento (el benceno, el tolueno, y los xilenos —BTX— son los principales contaminantes en cientos de miles de depósitos con pérdidas).

Existen informes sobre la degradación anaerobia de los hidrocarburos petrolíferos aromáticos mediante microorganismos (Ward y Brock, 1978; Grbic-Gallic y Vogel, 1987; Vogel y Grbic-Gallic, 1986; Zeyer et al., 1986, 1990). Hambrick et al. (1980) investigaron la emisión de $^{14}\text{CO}_2$ a partir del *n*-hexadecano y naftaleno radioetiquetados en fangos sedimentarios de estuarios, incubados durante 1 mes a diferentes potenciales redox, dentro de una variación de -250 a +510 mv. En los potenciales redox más bajos, no se detectó la biodegradación del naftaleno durante el período experimental de 1 mes, y la biodegradación del hexadecano fue al menos 4 veces menor que en el potencial redox más alto. Este estudio de laboratorio, junto con las mediciones de campo (Ward y Brock, 1978; Ward et al., 1980; De-laune et al., 1980), llevó a la conclusión general de que la importancia ecológica y ambiental de la biodegradación anaerobia de los hidrocarburos es muy baja en comparación con la biodegradación aerobia.

Aunque la presencia de oxígeno normalmente no es un limitante en los niveles superiores de la columna de agua en ambientes marinos y de agua dulce (Floodgate, 1984; Cooney, 1984), la disponibilidad de oxígeno en suelos, sedimentos y acuíferos, a menudo, sí es un limitante, y depende del tipo de suelo, y de si éste se encuentra saturado o no de oxígeno (Janison et al., 1975; Huddleston y Cresswell, 1976; Von Wedel et al., 1988; Bossert y Bortha, 1984; Lee y Levy, 1991). Cuando los contaminantes llegan al nivel freático y han contaminado los acuíferos, la disponibilidad de oxígeno es el principal problema de la biorrecuperación. La solubilidad del oxígeno en el agua es baja (a niveles de saturación cercanos a 8 mg/l), y la demanda de oxígeno para la degradación de los hidrocarburos es muy alta. La degradación microbiana de los hidrocarburos petrolíferos en algunas aguas subterráneas y suelos está severamente limitada por la disponibilidad de oxígeno. La oxidación de 1 l de hidrocarburo acabará con el oxígeno disuelto en 385.000-400.000 l de agua saturada (8 mg/l).

Las limitaciones de oxígeno se pueden superar suministrando oxígeno *in situ* a los microorganismos o mediante la colocación de los materiales contaminados en un biorreactor aerobio donde se pueda realizar el suministro. En el suelo superficial, se puede conseguir la oxigenación mediante un drenaje adecuado. Los espacios porosos llenos de aire del suelo facilitan la difusión del oxígeno, mientras que en el suelo saturado la difusión del oxígeno es extremadamente

lenta, no siendo posible mantener el ritmo de demanda de los procesos de descomposición heterotrófica. Las grandes concentraciones de residuos orgánicos en descomposición crean una demanda de oxígeno muy alta en los suelos, y la velocidad de difusión suele ser inadecuada para satisfacerla, incluso en suelos bien drenados y de textura ligera. El suelo subsuperficial no saturado (vadoso) normalmente es aerobio, pero una fuerte actividad de biodegradación de hidrocarburos puede acabar con el oxígeno más rápidamente de lo que puede ser reemplazado mediante difusión. En una situación como ésta, la subida y bajada periódica del nivel freático puede facilitar el intercambio de aire (Beraud et al., 1989).

Se han utilizado también técnicas de cultivo (arado de la tierra) para voltear el suelo y asegurar su máximo acceso al oxígeno atmosférico (Kincannon, 1972; CONCAWE 1980a; 1980b). En columnas de suelo de laboratorio, la proliferación microbiana en respuesta a la contaminación por combustible de aviones, y la biorrecuperación, fue de tres a cinco órdenes de magnitud en la zona cercana a la superficie de la columna, pero de menos de un orden de magnitud en la parte más profunda de la columna (Song y Bartha, 1990).

El compostaje y los biorreactores aerobios

El compostaje es un proceso microbiano aerobio que ha sido utilizado durante mucho tiempo para la degradación de los residuos orgánicos, p. ej., hojas, y que también puede ser empleado para la evacuación de diversos residuos peligrosos y petrolíferos, y para el tratamiento de suelos contaminados. Si se desea lograr un compostaje óptimo será necesario tener en cuenta una serie de condiciones. Debe existir una humedad adecuada (50-60 por ciento de contenido en agua), pero deberá evitarse un exceso de humedad (+70%), ya que interfiere con la aireación y hace descender el autocalentamiento por la gran capacidad calorífica del agua. El compostaje, con la ayuda de materiales espesantes generalmente inertes, tales como: trocitos de madera, cáscaras de arroz o de cacahuetes, también puede ser utilizado en la biodegradación de residuos químicos.

Unos residuos costeros, contaminados con petróleo, procedentes de un derrame marítimo fueron tratados con éxito en una pila de *compost* aireada (Labrie y Cyr, 1990). La arena, el barro y el material orgánico contaminados con petróleo fueron colocados sobre una lona impermeable, con una ligera pendiente para permitir la recogida de los lixiviados. La capa de grava por debajo del material contaminado contenía tuberías perforadas conectadas a un compresor de aire reversible. Después de 180 días de funcionamiento, las concentraciones iniciales de petróleo, de hasta un 30 por ciento, fueron reducidas hasta alcanzar valores por debajo de un 1 por ciento. En este momento, fueron vertidos los rechazos. Durante el mismo tratamiento, el contenido en hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) del contaminante se redujo desde las 283 ppm iniciales hasta 8 ppm.

Debido a su fuerte tendencia hacia la sedimentación, los biorreactores de mezcla completa para suelos son difíciles de diseñar y operar, sin embargo, los

flotantes procedentes de los procesos de lavado de suelo pueden biorrecuperarse eficazmente en las unidades de tratamiento aerobio de aguas residuales del tipo fangos activados (CONCAWE, 1980a; Morgan y Watkinson, 1989). Debería ser posible procesar suelos contaminados en biorreactores de compostaje (Pavoni et al., 1975), pero los tiempos de residencia necesarios son muy largos para la biodegradación de hidrocarburos, y los efectos poco favorables que las elevadas temperaturas tienen sobre el proceso, de momento, no favorecen este método.

Los sistemas de tratamiento con biorreactor aerobio, modificados a partir de los normalmente utilizados para el tratamiento de aguas residuales y cuyo objetivo es reducir la demanda biológica de oxígeno (DBO), también pueden ser empleados para la biodegradación de contaminantes. Muchas instalaciones industriales poseen tratamientos aerobios para los residuos que reducen la DBO global de los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales y, además, rebajan las concentraciones de contaminantes específicos.

Los biorreactores utilizados en las zonas industriales incluyen los procesos biopelícula de los filtros percoladores, en este tipo de biorreactor, una comunidad microbiana adherida mineraliza los nutrientes orgánicos disueltos que pasan por encima de los microorganismos fijos. La aireación se proporciona pasivamente mediante la naturaleza porosa del lecho. La sobrecarga puede provocar un exceso de biopelícula, lo que reduce las tasas de aireación y filtración, y hace necesaria una renovación del lecho del filtro percolador. Las bajas temperaturas del invierno reducen mucho el rendimiento de las instalaciones al aire libre. Un sistema de tratamiento biopelícula aerobio más avanzado es el contactador biológico rotatorio o sistema «biodisco». Unos discos poco separados entre sí, normalmente hechos de plástico, giran en el depósito que contiene el efluente. Mediante este método, pueden tratarse los tintes azoicos, algunos componentes de municiones, como el TNT, y otros tipos de residuos. Las fosas y lagunas de oxidación son sistemas de tratamiento a bajo coste que se utilizan con frecuencia para la evacuación de contaminantes sujetos a retención. Tienden a ser ineficaces y requieren una gran capacidad de almacenamiento y largos tiempos de retención. Como la oxigenación generalmente se consigue mediante difusión y la actividad fotosintética de las algas, necesitan tener poca profundidad. En algunos biorreactores se emplea la aireación forzada para suministrar el oxígeno necesario. Una laguna puede contar con tubos rociadores, distribuidores y deflectores de aire forzado para asegurar una buena aireación. Las plantas para tratamiento de agua de lastre, utilizadas para reducir el BTX antes de su vertido, normalmente se diseñan de esta forma. Un tipo más avanzado de sistema de tratamiento para los residuos líquidos, con aireación forzada, y empleado frecuentemente, es el proceso de fangos activados. El residuo líquido, que contiene compuestos orgánicos disueltos, se introduce en un depósito con aireación. La aireación se proporciona mediante inyección de aire y/o agitación mecánica. La actividad microbiana se mantiene a niveles muy altos mediante la recirculación de la mayor parte de los fangos activados sedimentados procedentes de un ciclo de tratamiento anterior, de ahí el nombre del proceso

Aireación *in situ*

En los acuíferos contaminados, se puede suministrar oxígeno mediante difusores de aireación forzada. El difusor de aire, sin embargo, es ineficaz y caro (Davis-Hoover, 1991). El aire no puede introducirse a mucha distancia del suelo contaminado y debe ser suministrado de forma continua. Jamison et al. (1975) utilizaron aireación forzada, con el fin de suministrar oxígeno, para lograr la biodegradación de los hidrocarburos presentes en un suministro de aguas subterráneas que habían sido contaminadas con gasolina. La adición de nutrientes, sin aireación, no consiguió estimular la biodegradación, pero cuando se suministraron nutrientes y oxígeno, se calculó que se habían eliminado hasta 1.000 barriles de gasolina mediante la degradación microbiana estimulada. Este tipo de manipulaciones para suministrar oxígeno probablemente no son factibles en sistemas abiertos, donde hay que depender de las fuerzas naturales, tales como el viento y la acción de las olas, para conseguir una mezcla turbulenta y un aporte extra de oxígeno capaz de soportar la biodegradación del petróleo.

Las limitaciones de oxígeno también es posible superarlas añadiendo peróxido de hidrógeno en concentraciones apropiadas (American Petroleum Institute, 1987; Yaniga y Smith, 1984; Brown et al., 1984, 1985; Thomas et al., 1987; Berwanger y Barker, 1988). La descomposición de peróxido de hidrógeno emite oxígeno, y éste es capaz de soportar el metabolismo microbiano aerobio. La concentración práctica del peróxido de hidrógeno en el agua inyectada se sitúa en torno a 10 ppm (Brown et al., 1984; Yaniga y Smith, 1984). Berwanger y Barker (1988) investigaron la biorrestauración *in situ* mediante la biodegradación aerobia estimulada sobre un medio anaerobio, este medio fueron unas aguas subterráneas saturadas con metano; para lograr la biodegradación aerobia utilizaron peróxido de hidrógeno como fuente de oxígeno. El peróxido de hidrógeno añadido a un nivel no tóxico proporcionó el oxígeno suficiente como para conseguir una biodegradación rápida del benceno, tolueno, etilbenceno, y *o*-, *m*-, y *p*-xileno. Frankenberger et al. (1989) realizaron estudios sobre un escape de 1.000 galones de gasóleo de un depósito subterráneo.

La descomposición demasiado rápida del peróxido de hidrógeno crea bolsas de gas que interfieren con las operaciones posteriores de bombeo. Por esta razón, el peróxido de hidrógeno se aplica conjuntamente con estabilizantes que desaceleran su descomposición (Brown et al., 1984). Las fórmulas de los estabilizantes son privadas y no se publican sus composiciones. Algunos compuestos con propiedades estabilizantes, tales como los fosfatos, pueden realizar el doble papel de estabilizantes y fertilizantes.

En un trabajo de campo, se inyectó peróxido de hidrógeno a un acuífero contaminado a una velocidad de 750 mg/l durante medio año (Huling et al., 1991). El gradiente de la concentración de oxígeno indicó claramente que el oxígeno había llegado a la zona saturada del suelo desde los puntos de inyección. Los niveles de oxígeno emitidos fueron lo suficientemente altos como para provocar alguna inhibición de la actividad bacteriana. Aproximadamente, la mitad del oxígeno emitido del peróxido de hidrógeno fue transferido a la fase gaseosa.

En otro estudio sobre la adición de peróxido de hidrógeno para hacer factible la biorrecuperación, Barendse et al. (1991) descubrieron que los hidrocarburos de los combustibles diésel se degradaban entre 4 y 7 veces más rápidamente cuando se añadía peróxido de hidrógeno que cuando se añadía nitrato como receptor terminal de electrones para la respiración. La adición de peróxido de hidrógeno incrementó en dos órdenes de magnitud el cómputo de microorganismos degradadores de hidrocarburos, aumentó cinco veces la producción de dióxido de carbono, y consiguió biodegradar entre un 70-80 por ciento de los hidrocarburos contaminantes. De forma similar, Flatham et al. (1991) descubrieron que la adición de peróxido de hidrógeno a las columnas de suelo para ensayos incrementaba mucho las tasas de biodegradación de hidrocarburos en el combustible JP-5. Lee y Raymond (1991) dieron a conocer el gran éxito que supuso, en la recuperación de un acuífero contaminado con gasolina, la utilización de arrastre por aire y la biorrecuperación bioestimulada con peróxido de hidrógeno.

La Guardia Costera (USA) y EPA (USA) llevaron a cabo una evaluación de campo sobre biorrecuperación en los derrames de combustible de la Base Aérea USCG, en Traverse City, Michigan, en este lugar se inyectó peróxido a un derrame de gasolina aeronáutica (Wilson, 1991). Se inyectaron, en pozos localizados en la zona contaminada con gasolina, 11 gal/min de agua con concentraciones de peróxido cercanas a los 750 mg/l. Se inyectó agua limpia, procedente de otra parte del acuífero, a 22 gal/min, de esta forma se consiguió subir el nivel freático e inundar la capa o estrato contaminado con gasolina. Después de 18 meses de operación, la concentración de benceno en los pozos de control, situados hasta 30 metros de los pozos de inyección, fue menor de 0,1 µg/l. Las concentraciones de los demás alquilbencenos estaban por debajo de los 5 µg/l en los pozos situados a 15 metros de los pozos de inyección. Sin embargo, el material extraído a tan sólo 2,5 metros del pozo de inyección todavía contenía 700 mg/kg de hidrocarburos de petróleo totales.

Nutrientes y fertilización

El nitrógeno, el fósforo, y otros nutrientes minerales son necesarios para su incorporación en la biomasa. Las concentraciones de nitrógeno y fósforo disponibles, a menudo, limitan la velocidad de degradación microbiana; por ejemplo, muchos informes demuestran que las concentraciones de nitrógeno y fósforo en el agua del mar limitan la velocidad de degradación de los hidrocarburos después de los derrames de petróleo (Atlas y Bartha, 1972; Bartha y Atlas, 1973; Floodgate, 1973, 1979; Gunkel, 1967; Leahy y Colwell, 1990). Tomando como base petróleo crudo de Kuwait, a 14 °C, la demanda de nitrógeno es de 4 nmoles de nitrógeno por g de petróleo (Floodgate, 1979). Colwell et al. (1978) llegaron a la conclusión de que el petróleo del derrame de Matulla se degradó lentamente en el ambiente marino, probablemente, debido a las limitaciones impuestas por las concentraciones relativamente bajas de nitrógeno y fósforo disponibles en el agua de mar. De modo semejante a lo que sucede en el medio acuático, la disponibilidad de nitrógeno y

fósforo también puede limitar la biodegradación de hidrocarburos dentro del ámbito terrestre (Dibble y Bartha, 1979a; Bossert y Bartha, 1984; Bartha, 1986).

Fertilización del suelo y tratamiento del terreno para la evacuación de residuos aceitosos

En el *tratamiento del terreno*, se aplican al suelo fangos aceitosos. A principios de los años 70 se inició la supervisión científica de la aplicación de fangos al terreno (Kincannon, 1972; Francke y Clark, 1974). Más adelante, y sistemáticamente, se fue optimizando el proceso en los experimentos de campo y de laboratorio (Lehtomake y Niemela, 1975; Maunder y Waid, 1973, 1975; Raymond et al., 1976; Huddleston y Meyers, 1978; Dibble y Bartha, 1979b; Arora et al., 1982; Brown y Donnelly, 1983; Sandvik et al., 1986; Shailubhai, 1986; Amaral, 1987; Tesan y Barbosa, 1987).

Algunas de las recomendaciones prácticas para el tratamiento del terreno fueron resumidas por el American Petroleum Institute (API) (1980) (Instituto del Petróleo Americano) en Estados Unidos, y por CONCAWE (1980b) en Europa. El petróleo se aplica a velocidades que consiguen una concentración de hidrocarburos del 5 por ciento en los 15-20 cm superiores del suelo. Las concentraciones de hidrocarburos por encima del 10 por ciento son, definitivamente, inhibitorias para la biodegradación. Este límite se traduce en aproximadamente 100.000 l de hidrocarburos por hectárea, normalmente, con un volumen de fangos que es entre 3 y 4 veces mayor (Dibble y Bartha, 1979a). El pH del suelo se ajusta a un valor comprendido entre 7 y 8, o al valor práctico más cercano, utilizando caliza agrícola. Se aplican fertilizantes de nitrógeno y fósforo en las siguientes relaciones; hidrocarburo:N = 200:1 e hidrocarburo:P = 800:1. Los hidrocarburos no degradados no lixivian con facilidad a las aguas subterráneas desde las zonas de tratamiento del terreno (Dibble y Bartha, 1979b), y parece ser mínimo el impacto ambiental en las zonas gestionadas de forma correcta (Arora et al., 1982).

Song et al. (1990), descubrieron que el proceso es más apto para las fracciones medias del petróleo. Aunque la gasolina responde a la biorrecuperación en suelos superficiales, la biodegradación es inferior a la velocidad de evaporación, y la mayor parte del producto se pierde en la atmósfera. En experimentos de laboratorio, Song et al. (1990) tuvieron un éxito muy limitado con el fuel n.º 6 (residual). Sin embargo, Jones y Greenfield (1991) obtuvieron unos resultados bastante prometedores en un trabajo de biorrecuperación *in situ* en Florida. El suelo contaminado con una media de 10.000 ppm de fuel n.º 6 fue tratado con fertilizantes. Se volteó el suelo, se cultivó y se mantuvo húmedo mediante rociadores cuando fue necesario. En 300 días se eliminó cerca del 90 por ciento del contaminante, quedando aproximadamente 1.000 ppm de residuo, que incluía HPAs.

Nutrición de acuíferos

Cuando se bombea un acuífero contaminado, para que la contaminación no se extienda, se añaden nutrientes minerales (nitrógeno y fósforo) al agua recuperada y

se airea. La combinación de biodegradación y de arrastre por aire libera al agua recuperada de los contaminantes disueltos. El agua, conteniendo ya gran número de microorganismos degradadores de hidrocarburos, es devuelta al acuífero cerca de la zona contaminada. Este método de «bombear y tratar» es ayudado posteriormente por la actividad *in situ* de microorganismos inyectados (Lee y Ward, 1985; Brown et al., 1985; Thomas et al., 1987). Para maximizar la actividad *in situ*, el agua puede ser enriquecida, antes de la inyección, con nutrientes minerales adicionales y otros materiales que sirven como receptores de electrones para la oxidación de los hidrocarburos.

La biorrecuperación de acuíferos contaminados con aromáticos halogenados, haloetanos y halometanos presenta problemas más complejos (Kuhn et al., 1985; Wilson et al., 1986; Berwanger y Barker, 1988). Aunque algunos de estos materiales se deshalogenan anaerobiamente, otros no pueden servir como sustratos, ni bajo condiciones aerobias ni anaerobias, y son atacados tan sólo cometabólicamente.

Un derrame de JP-4 fue recuperado mediante nutrientes minerales y nitratos (Wilson, 1991). Una zona de estudio, de 10 m × 10 m, fue inundada con 200 gal/min de agua desde la parte inferior del derrame. El agua tardó 8 horas en pasar por la zona contaminada y, posteriormente, una semana en llegar a los grandes pozos productores que suministraban agua a la galería de infiltración situada sobre la zona de estudio. Durante 2 meses se hizo circular agua sin aditivos para conseguir un equilibrio químico entre el agua y el petróleo. Después, se hizo circular 10 mg/l de nitratos durante 2 meses adicionales. Antes de añadir los nitratos, el benceno se hizo descender por debajo de 0,1 mg/l. Después de la adición de nitratos, los demás alquilbencenos bajaron a menos de 5 µg/l.

La adición de fosfatos a los acuíferos puede provocar una precipitación que puede llegar a taponar el acuífero (Aggarwal et al., 1991). Unos ensayos de laboratorio empleando suelos contaminados con hidrocarburos, demostraron que una concentración de fosfatos de 20 mg/l en el suelo del acuífero es suficiente como para crear un exceso de fosfatos que limite el crecimiento microbiano. Los fosfatos, sin embargo, se precipitarán en forma de sal de calcio si se añaden a suelos calcáreos con altas concentraciones de calcio. En los suelos arenosos de cuarzo, los fosfatos no darán lugar a un exceso de precipitados si se añaden en forma de ortofosfatos hasta 20 mg/l. Para concentraciones mayores, los fosfatos pueden ser añadidos en forma de trimetilfosfato.

Fertilizantes oleofílicos

Para los derrames en suelos marinos, Atlas y Bartha (1973) desarrollaron un fertilizante de nitrógeno y fósforo oleofílico que permanecería en contacto con el petróleo en la interfase petróleo/agua, donde tiene lugar la biodegradación microbiana de los hidrocarburos. El fertilizante diseñado por Atlas y Bartha (1973) contiene urea parafinizada y octil fosfato, pero cualquier otra gama de compuestos oleofílicos de nitrógeno y fósforo podría servir de igual forma (Atlas y Bartha, 1976). Atlas y Bartha ensayaron la eficacia de los fertilizantes oleofílicos en zonas cerca-

nas a la costa de New Jersey (Atlas y Bartha, 1973), en Prudhoe Bay, y en diversas dársenas cercanas a Barrow, Alaska (Atlas y Schofield, 1975; Atlas y Busdosh, 1976); en cada caso, los ensayos se realizaron *in situ* e *in vitro*. Además, el fertilizante fue probado en diferentes microcosmos para potenciales aplicaciones en el Ártico (Horowitz y Atlas, 1977). En cada caso existía una población natural de microorganismos que podía biodegradar el petróleo cuando el fertilizante oleofílico era añadido a un derrame de petróleo, y, en cada caso, la adición de fertilizante oleofílico estimuló las pérdidas biodegradativas.

Olivieri et al. (1976) describieron un fertilizante de emisión lenta, que contenía fosfato-amónico-magnésico apoyado con parafina, como ingrediente activo para estimular la biodegradación del petróleo. Después de transcurridos 21 días a partir de ser añadido el fertilizante, el 63 por ciento del petróleo había desaparecido, frente a un 40 por ciento registrado en la zona de control. Olivieri et al. (1978) también descubrieron una combinación de lecitina de soja y etil-alofanato capaz de proporcionar buenas fuentes oleofílicas de fósforo y nitrógeno, respectivamente. Bergstein y Vestal (1978) comprobaron que el fertilizante oleofílico mejora la biodegradación del petróleo crudo en dársenas y lagos oligotróficos.

Se ha demostrado que una baja disponibilidad de hierro limita la biodegradación de los hidrocarburos, pero la misma limitación no se mostró evidente en el agua de mar cercana a la costa, rica en sedimentos (Dibble y Bartha, 1976). No se han encontrado, ni se sospecha que existan, otros nutrientes minerales limitantes de la biodegradación del petróleo en el agua de mar, sin embargo, en algunos ambientes de agua dulce, la concentración de sulfatos puede ser insuficiente para sostener una óptima biodegradación del petróleo (Barth, 1986). Dibble y Bartha (1976) comprobaron que se producía una estimulación adicional de la biodegradación del petróleo cuando se añadía hierro oleofílico en forma de octanoato férrico junto con nitrógeno y fósforo. Solamente se observó una estimulación mayor en las aguas marinas libres de sedimentos, no en las aguas costeras ricas en sedimentos. La adición de hierro oleofílico sólo parece útil en mar abierto, donde las concentraciones de hierro son especialmente bajas.

Después del derrame del *Amoco Cádiz*, en 1978, la empresa Elf Aquitaine (París, Francia) desarrolló un fertilizante oleofílico comercial (Sirvins y Angeles, 1986; LaDousse et al., 1987; Sveum y LaDousse, 1989; Tramier y Sirvins, 1983; LaDousse y Tramier, 1991). El producto, llamado Inipol® EAP22, contiene urea como fuente de nitrógeno, laurilfosfato como fuente de fósforo, y ácido oleico como fuente de carbono para incrementar la población de microorganismos degradadores de los hidrocarburos. Su fórmula es la de una microemulsión. Los experimentos realizados en el laboratorio mostraron la importante mejora que se producía en la biodegradación del petróleo; en algunos experimentos, el 60 por ciento del petróleo añadido fue biodegradado en matraces fertilizados, frente a un 38 por ciento en los no fertilizados, dentro de un período de 60 días (LaDousse et al., 1987). En ensayos de saturación con oxígeno de alta energía (LaDousse et al., 1987) se obtuvo un aumento incluso mayor, el 70 por ciento de biodegradación en el material fertilizado, frente a tan sólo un 20 por ciento en el no fertilizado. Los ensayos realizados en campo también mostraron mayores velocidades de biodegradación

con la aplicación del fertilizante Inipol EAP 22, incluso en ensayos fríos, en el Ártico (Sirvins y Angeles, 1986; Sveum y LaDousse, 1989).

Pritchard y Costa (1991) observaron que el Inipol EAP 22 no era tan eficaz como el nitrógeno soluble en agua y los fertilizantes que contienen fósforo, a la hora de mejorar la biodegradación del petróleo subsuperficial. Comprobaron que el 50-60 por ciento del amoníaco y del fosfato del Inipol EAP 22 se emitían a los pocos minutos de su aplicación, después tenía lugar una emisión más lenta durante las semanas posteriores. Salferman (1991) ensayó con varias fórmulas de nitrógeno de emisión lenta para tratar las costas contaminadas en el derrame del *Exxon Valdez*. En sus ensayos, los briquetes de diurea isobutiraldehído daban los mejores resultados en términos de emisión de amoníaco.

A pesar de la complejidad del muestreo y de la interpretación, debido a una alta variabilidad en la distribución del petróleo sobre las playas, fue posible demostrar estadísticamente que la biodegradación del petróleo (medida por los cambios en el peso de los residuos y en la química del petróleo) fue significativamente mayor en la playa tratada con el fertilizante que en la playa de referencia (Prince et al., 1990; Pritchard y Costa, 1991). Después de 45 días, había entre 3 y 4 veces más petróleo en la playa de referencia que en la tratada con fertilizante. Esto se corresponde con una velocidad de biodegradación aumentada de dos a tres veces. Los resultados parecían similares en la playa tratada con Inipol-Customblen, pero para esta playa fue difícil establecer unas diferencias estadísticamente significativas con respecto a la playa de referencia. Sin embargo, parece que se produjo una biodegradación acelerada (aproximadamente, en el orden de 2 a 3) al principio del ensayo, cuando las concentraciones de nutrientes eran mayores. Estos resultados indican que es importante la reaplicación de fertilizantes (manteniendo las concentraciones de nutrientes a altos niveles durante largos períodos).

Como consecuencia del proyecto EPA-Exxon, quedó demostrado que la biorrecuperación de las playas contaminadas con petróleo era una tecnología de limpieza segura; no se observó ningún efecto ecológico adverso (Fox, 1990; Oficina de Evaluación Tecnológica, 1991). La adición de fertilizantes no provocó ninguna eutroficación, ni toxicidad aguda para las especies marinas sensibles, y no provocó tampoco la emisión desde las playas de los residuos de petróleo no degradados. El éxito del programa de demostración real ya ha preparado el campo para considerar la biorrecuperación como un componente clave (pero no el único) en cualquier estrategia de limpieza para futuros derrames de petróleo.

Referencias bibliográficas

- Adriaens, P. H., P. E. Kohler, and D. Kohler-Staub. 1989. Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4,4'-dichlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:887-892.
- Adrian, N. R., and J. M. Sufliata. 1990. Reductive dehalogenation of a nitrogen heterocyclic herbicida in anoxic aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:292-294.

- Aggarwal, P. K., J. L. Means, and R. E. Hinchee. 1991. Formulation of nutrient solutions for in situ biodegradation. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 51-66.
- Amaral, S. P. 1987. Landfarming of oily wastes: Design and operation. *Water, Sej. Technol.* 19:75-86.
- American Petroleum Institute. 1980. *Manual on Disposal of Petroleum Wastes*. American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- American Petroleum Institute. 1987. *Field Study of Enhanced Subsurface Biodegradation of Hydrocarbons Using Hydrogen Peroxide as an Oxygen Source*. American Petroleum Institute Publ. 4448. American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- Arora, H. S., R. R. Cantor, and J. C. Nemeth. 1982. Land treatment: A viable and successful method of treating petroleum industry wastes. *Environ. Int.* 7:285-292.
- Atlas, R. M. (ed.). 1984. *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York.
- Atlas, R. M., and R. Bartha. 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: Limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioeng.* 14:309-317.
- Atlas, R. M., and R. Bartha. 1973. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environ. Sci. Technol.* 7:538-541.
- Atlas, R. M., and R. Bartha. 1976. Biodegradation of oil on water surfaces. U.S. Patent 3,939,127.
- Atlas, R. M., and M. Busdosh. 1976. Microbial degradation of petroleum in the Arctic. In J. M. Sharpley and A. M. Kaplan (eds.), *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*. Applied Science Publ., London, pp. 79-86.
- Atlas, R. M., and E. A. Schofield. 1975. Petroleum biodegradation in the Arctic. In A. W. Bourquin, D. G. Ahearn, and S. P. Meyers (eds.), *Impact of the Use of Microorganisms on the Aquatic Environment*. EPA 660-3-75-001. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR.
- Barenschee, E. R., P. Bochem, O. Helmling, and P. Weppen. 1991. Effectiveness and kinetics of hydrogen peroxide and nitrate-enhanced biodegradation of hydrocarbons. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 103-124.
- Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* 12:155-172.
- Bartha, R., and R. M. Atlas. 1973. Biodegradation of oil in seawater: Limiting factors and artificial stimulation. In D. G. Ahearn and S. P. Meyers (eds.), *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*. Publ. no. LSU-SG-73-01. Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, pp. 147-152.
- Beraud, J.-F., J. D. Ducreux, and C. Gatellier. 1989. Use of soil-aquifer treatment in oil pollution control of underground waters. In *Proceedings of the 1989 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp. 53-59.
- Bergstein, P. E., and J. R. Vestal. 1978. Crude oil biodegradation in Arctic tundra ponds. *Arctic* 31:158-169.
- Berwanger, D. J., and J. F. Barker. 1988. Aerobic biodegradation of aromatic and chlorinated hydrocarbons commonly detected in landfill leachate. *Water Pollut. Res. J. Can.* 23(3):460-475.
- Bossert, I., and R. Bartha. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York, pp. 473-476.

- Brown, K. W., and K. S. Donnelly. 1983. Influence of soil environment on biodegradation of a refinery and a petrochemical sludge. *Environ. Pollut. Ser. B* 6:119-132.
- Brown, R. A., R. D. Norris, and R. L. Raymond. 1984. Oxygen transport in contaminated aquifers. In *Proceedings of the Conference on Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water-Prevention, Detection, and Restoration*. National Water Well Association, Worthington, OH, pp. 441-450.
- Brown, R. A., R. D. Norris, and G. R. Brubaker. 1985. Aquifer restoration with enhanced bioreclamation. *Pollut. Eng.* 17:25-28.
- Brunner, W., S. H. Southerland, and D. D. Focht. 1985. Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil by analog enrichment and bacterial inoculation. *J. Environ. Quality* 14:324-328.
- Colwell, R. R., A. L. Mills, J. D. Walker, P. García-Rello, and V. Campos-P. 1978. Microbial ecology studies of the Metula spill in the Straits of Magellan. *J. Fish. Res. Board Can.* 35:573-580.
- CONCAWE. 1980a. *Disposal Techniques for Spilt Oil*. Rep. 9/80, CONCAWE, The Hague.
- CONCAWE. 1980b. *Sludge Farming: A Technique for the Disposal of Oily Refinery Wastes*. Rep. 3/80, CONCAWE, The Hague.
- Cooney, J. J. 1984. The fate of petroleum pollutants in fresh-water ecosystems. In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York.
- Davis-Hoover, W. J., L. C. Murdoch, S. J. Vesper, H. R. Pahren, O. L. Sprockel, C. L. Chang, A. Hussain, and W. A. Ritschel. 1991. Hydraulic fracturing to improve nutrient and oxygen delivery for in situ bioreclamation. In R. E. Hinchey and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 67-82.
- Delaune, R. D., G. A. Hambrick, and W. H. Patrick. 1980. Degradation of hydrocarbons in oxidized and reduced sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 11:103-106.
- Dalton, H., and D. I. Stirling. 1982. Co-metabolism. *Philosoph. Trans. R. Soc. London Ser. B* 297:481-491.
- Dibble, J. T., and R. Bartha. 1976. The effect of iron on the biodegradation of petroleum in sea-water. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:544-550.
- Dibble, J. T., and R. Bartha. 1979a. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:729-739.
- Dibble, J. T., and R. Bartha. 1979b. Leaching aspects of oil sludge biodegradation in soil. *Soil Sci.* 127:365-370.
- Dolfing, J., and J. M. Tiedje. 1987. Growth yield increase linked to reductive dechlorination in a defined 3-chlorobenzoate degrading methanogenic coculture. *Arch. Microbiol.* 149:102-105.
- Fathepure, B. Z., J. M. Tiedje, and S. A. Boyd. 1988. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:327-330.
- Flathman, P. E., K. A. Khan, D. M. Barnes, J. H. Carson, S. J. Whitehead, and J. S. Evans. 1991. Laboratory evaluation of the utilization of hydrogen peroxide for enhanced biological treatment of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. In R. E. Hinchey and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 125-142.
- Floodgate, G. D. 1973. A threnody concerning the biodegradation of oil in natural water. In D. G. Ahearn and S. P. Meyers (eds.), *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*.

- Publ. no. LSU-SG-73-01. Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge, pp. 17-24.
- Floodgate, G. D. 1979. Nutrient limitation. In A. W. Bourquin and P. H. Pritchard (eds.), *Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments*. EPA-660/9-79-012. Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, FL, pp. 107-119.
- Floodgate, G. 1984. The fate of petroleum in marine ecosystems. In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York.
- Fogel, M. M., A. R. Taddeo, and S. Fogel. 1986. Biodegradation of chlorinated ethanes by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:720-724.
- Fox, J. E. 1990. More confidence about degrading work. *Bio/Technology* 8:604.
- Francke, H. C., and F. E. Clark. 1974. *Disposal of oil wastes by microbial assimilation*. Report Y-1934. U.S. Atomic Energy Commission, Washington, D.C.
- Frankenberger, W. T., Jr., K. D. Emerson, and D. W. Turner. 1989. In situ bioremediation of an underground diesel fuel spill: A case history. *Environ. Manage.* 13:325-332.
- Galli, R., and P. L. McCarty. 1989. Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 837-844.
- Genthner, B. R. S., W. A. Price, and P. H. Pritchard. 1989a. Anaerobic degradation of chloroaromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1466-1471.
- Genthner, B. R. S., W. A. Price, and P. H. Pritchard. 1989b. Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1472-1476.
- Grbic-Galic, D., and T. M. Vogel. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic-cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:254-260.
- Gunkel, W. 1967. Experimentell-okologische Untersuchungen uber die limitierenden Faktoren des mikrobiellen Olabbaues in marinen Milieu. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 15: 210-224.
- Hambrick, G. A., III, R. D. DeLaune, and W. H. Patrick, Jr. 1980. Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 40:365-369.
- Horowitz, A., and R. M. Atlas. 1977. Continuous open flow-through system as a model for oil degradation in the Arctic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:647-684.
- Huddleston, R. L., and L. W. Cresswell. 1976. Environmental and nutritional constraints of microbial hydrocarbon utilization in the soil. In *Proceedings of the 1975 Engineering Foundation Conference: The Role of Microorganisms in the Recovery of Oil*. NSF/RANN, Washington, D.C., pp. 71-72.
- Huddleston, R. L., and J. D. Meyers. 1978. Treatment of refinery oily wastes by landfarming. Paper presented at the 85th National Meeting of AIChE. Philadelphia, PA, American Institute of Chemical Engineers, New York.
- Hurling, S. G., B. E. Bledsoe, and M. V. White. 1991. The feasibility of utilizing hydrogen peroxide as a source of oxygen in bioremediation. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 83-102.
- Jamison, V. M., R. L. Raymond, and J. O. Hudson, Jr. 1975. Biodegradation of high-octane gasoline in groundwater. *Dev. Ind. Microbiol.* 16:305-312.
- Jones, M., and J. H. Greenfield. 1991. In situ comparison of bioremediation methods for a Number 6 residual fuel oil spill in Lee County, Florida. In *Proceedings of the 1991*

- International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp. 533-540.
- Kincannon, C. B. 1972. *Oily waste disposal by soil cultivation process*. EPA-R2-72-100. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Kuhn, E. P., P. J. Colberg, J. L. Schnoor, O. Wanner, A. J. B. Zehnder, and R. P. Schwarzenbach. 1985. Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: Laboratory column studies. *Environ. Sci. Technol.* 19: 961-968.
- Labrie, P., and B. Cyr. 1990. Biological remediation of shoreline oily waste from marine spills. In *Proceedings of the Thirteenth Annual Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar*. Environment Canada, Ottawa, Canada, pp. 339-387.
- LaDousse, A., C. Tallee, and B. Tramier. 1987. Progress in enhanced oil degradation. Paper presents: *Proceedings of the 1987 Oil Spill Conference*. Abstract 142. American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- LaDousse, A., and B. Tramier. 1991. Results of 12 years of research in spilled oil bioremediation: Inipol EAP 22. In *Proceedings of the 1991 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp. 577-581.
- Lee, K., and E. M. Levy. 1991. Bioremediation: Waxy crude oils stranded on low-energy shorelines. In *Proceedings of the 1991 International Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp. 541-547.
- Lee, M. D., and R. L. Raymond, Sr. 1991. Case history of the application of hydrogen peroxide as an oxygen source for in situ bioreclamation. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 429-438.
- Lee, M. D., and C. H. Ward. 1985. Biological methods for the restoration of contaminated aquifers. *Environ. Toxicol. Chem.* 4:743-750.
- Leahy, J. G., and R. R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54:305-315.
- LePetit, J., and M. H. Barthelemy. 1968. Les hydrocarbures en mer: Le probleme de l'epuration des zones littorales par les microorganismes. *Ann. Inst. Pasteur Paris* 114:149-158.
- LePetit, J., and M.-H. N'Guyen. 1976. Besoins en phosphore des bacteries metabolisant les hydrocarbures en mer. *Can. J. Microbiol.* 22:1364-1373.
- Lehtomake, M., and S. Niemela. 1975. Improving microbial degradation of oil in soil. *Ambio* 4:126-129.
- Linkfield, T. G., J. M. Suflita, and J. M. Tiedje. 1989. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of halobenzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2773-2778.
- Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lindstrom, R. L. Tyndall, and P. J. Gilmer. 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:951-956.
- McCarty, P. L., L. Semprini, M. E. Dolan, T. C. Harmon, C. Tiedeman, and S. M. Gorelick. 1991. In situ methanotrophic bioremediation for contaminated groundwater at St. Joseph, Michigan. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 16-40.
- Maunder, B. R., and J. S. Waid. 1973. Disposal of waste oil by land spreading. In *Proceedings of the Pollution Research Conference*, 20-21 June 1973, Wairakei,

- New Zealand. Information Series No. 97. New Zealand Department of Scientific and Industrial Research, Wellington.
- Maunder, B. R., and J. S. Waid. 1975. Disposal of waste oil by land spreading. *Paper presented at the Third International Biodeterioration Symposium*, 17-23 August, University of Rhode Island, Kingston.
- Mohn, M. M., and J. M. Tiedje. 1990a. Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. *Arch. Microbiol.* 153:267-271.
- Mohn, M. M., and J. M. Tiedje. 1990b. Catabolite thiosulfate disproportionation and carbon dioxide reduction in strain DCB-L, a reductively dechlorinating anaerobe. *J. Bacteriol.* 172:2065-2070.
- Moore, A. T., A. Vira, and S. Fogel. 1989. Biodegradation of trans-1,2-dichloroethylene by methane-utilizing bacteria in an aquifer simulator. *Environ. Sci. Technol.* 23:403-406.
- Morgan, P., and R. J. Watkinson. 1989. Hydrocarbon biodegradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 8(4):305-333.
- Novick, N. J., and M. Alexander. 1985. Cometabolism of low concentrations of propachlor, alachlor, and cycloate in sewage and lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:737-743.
- Office of Technology Assessment. 1991. *Bioremediation for Marine Oil Spills*. United States Congress, Washington, D.C.
- Olivieri, R. P., P. Bacchin, A. Robertiello, N. Oddo, L. Degen, and A. Tonolo. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:629-634.
- Olivieri, R., A. Robertiello, and L. Degen. 1978. Enhancement of microbial degradation of oil pollutants using lipophilic fertilizers. *Mar. Pollut. Bull.* 9:217-220.
- Palumbo, A. V., W. Eng, P. A. Boerman, G. W. Strandberg, T. L. Donaldson, and S. E. Herbes. 1991. Effects of diverse organic contaminants of trichloroethylene degradation by methanotrophic bacteria and methane-utilizing consortia. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 77-91.
- Pavoni, J. L., J. E. Heer, Jr., and D. J. Hagerty. 1975. *Handbook of Solid Waste Disposal, Materials and Energy Recovery*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Pfaender, F. K., and M. Alexander. 1972. Extensive microbial degradation of DDT in vitro and DDT metabolism by natural communities. *J. Agric. Food Chem.* 20:842-846.
- Prince, R., J. R. Clark, and J. E. Lindstrom. 1990. *Bioremediation Monitoring Program*. Joint Report of Exxon, the U.S. EPA, and the Alaskan Dept. of Environmental Conservation, Anchorage, AK.
- Pritchard, P. H., and C. F. Costa. 1991. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. *Environ. Sci. Technol.* 25:372-379.
- Raymond, R. L., J. O. Hudson, and J. W. Jamison. 1976. Oil degradation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:522-535.
- Safferman, S. I. 1991. Selection of nutrients to enhance biodegradation for remediation of oil spilled on beaches. In *Proceedings of the 1991 international Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp. 571-576.
- Sandvik, S., A. Lode, and T. A. Pedersen. 1986. Biodegradation of oil sludge in Norwegian soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:297-301.
- Semprini, L., G. D. Hopkins, P. V. Roberts, and P. L. McCarty. 1991. In situ biotransformation of carbon tetrachloride, Freon-113, Freon-11 and 1,1,1-TCA under anoxic conditions. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes*

- ses for *Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 41-58.
- Sirvins, A., and M. Angeles. *Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons*. NATO ASI Series, Volume G9.
- Shailubhai, K. 1986. Treatment of petroleum industry oil sludge in soil. *Trends Biotechnol.* 4:202-206.
- Song, H.-G., and R. Bartha. 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:646-651.
- Song, H.-G., X. Wang, and R. Bartha. 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:652-656.
- Stevens, T. O., and J. M. Tiedje. 1988. Carbon dioxide fixation and mixotrophic metabolism by strain DCB-1, a dehalogenating anaerobic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2944-2948.
- Stevens, T. O., T. G. Linkfield, and J. M. Tiedje. 1988. Physiological characterization of strain DCB-1, a unique dehalogenating sulfidogenic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2938-2943.
- Sveum, P., and A. LaDousse. 1989. Biodegradation of oil in the Arctic: Enhancement by oil-soluble fertilizer application. In *Proceedings of the 1989 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp. 439-446.
- Tesan, G., and D. Barbosa. 1987. Degradation of oil by land disposal. *Water Sci. Technol.* 19:99-106.
- Thomas, J. M., M. D. Lee, P. B. Bedient, R. C. Borden, L. W. Carter, and C. H. Ward. 1987. *Leaking Underground Storage Tanks: Remediation with Emphasis on in situ Bioreclamation*. EPA/600/S2-87/008. U.S. Environmental Protection Agency, Ada, OK.
- Tramier, B., and A. Sirvins. 1983. Enhanced oil biodegradation: A new operational tool to control oil spills. In *Proceedings of the 1983 Oil Spill Conference*. American Petroleum Institute, Washington, D.C.
- Uchiyama, H., T. Nakajima, and O. Yagi. 1989. Aerobic degradation of trichloroethylene at high concentration by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1019-1024.
- Vogel, T. M., and D. Grbic-Galic. 1986. Incorporation of oxygen from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:200-202.
- Vogel, T. M., and P. L. McCarty. 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, dichloroethylene, vinyl chloride and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1080-1083.
- von Wedel, R. J., J. F. Mosquera, C. D. Goldsmith, G. R. Hater, A. Wong, T. A. Fox, W. T. Hunt, M. S. Paules, J. M. Quiros, and J. W. Wiegand. 1988. Bacterial biodegradation and bioreclamation with enrichment isolates in California. *Water Sci. Technol.* 20:501-503.
- Ward, D. M., and T. D. Brock. 1978. Anaerobic metabolism of hexadecane in marine sediments. *Geomicrobiol. J.* 1:1-9.
- Ward, D., R. M. Atlas, P. D. Boehm, and J. A. Calder. 1980. Microbial biodegradation and the chemical evolution of Amoco Cádiz oil pollutants. *Ambio* 9:277-283.
- Wilson, B. H., G. B. Smith, and J. F. Rees. 1986. Biotransformations of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer material: a microcosm study. *Environ. Sci. Technol.* 20:997.
- Wilson, J. 1991. Performance evaluations of in situ bioreclamation of fuel spills at Traver-

- se City, Michigan. In *Proceedings of the In Situ and On-Site Bioreclamation: An International Symposium*. Butterworth, Stoneham, MA.
- Wilson, J. T., and B. H. Wilson. 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:242-243.
- You, I.-S., and R. Bartha. 1982. Stimulation of 3,4-dichloroaniline mineralization by aniline. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:678-681.
- Yaniga, P. M., and W. Smith. 1984. Aquifer restoration via accelerated in situ biodegradation of organic contaminants In *Proceedings of the Conference on Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water-Prevention, Detection, and Restoration*. National Water Well Association, Worthington, OH, pp. 451-470.
- Zeyer, J., E. P. Kuhn, and P. R. Schwarzenbach. 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:944-947.
- Zeyer, J., P. Eicher, J. Dolfing, and P. R. Schwarzenbach. 1990. Anaerobic degradation of aromatic hydrocarbons. In D. Kamely, A. Chakrabarty, and G. S. Omenn (eds.), *Biotechnology and Biodegradation*. Gulf Publishing, Houston, TX, pp. 33-40.

Capítulo 3

PRINCIPIOS Y PRÁCTICAS DE BIOTRATAMIENTO UTILIZANDO MICROORGANISMOS MODIFICADOS

B. D. Ensley

Envirogen

Lawrenceville, New Jersey

G. J. Zylstra

Universidad de Rutgers

New Brunswick, New Jersey

Cualquier uso comercial de microorganismos, incluyendo la degradación de residuos peligrosos, conduce pronto a ciertas especulaciones sobre la posibilidad de que determinadas modificaciones genéticas posiblemente mejorarían las actividades desarrolladas por los mismos. La forma de conseguir estos cambios genéticos puede variar desde una búsqueda de las frecuencias de mutación natural, hasta la utilización de mutágenos y de otras técnicas sofisticadas de biología molecular. Cada uno de estos métodos presenta sus propios «pros» y «contras» que serán discutidos a continuación.

Los científicos que buscan mejorar los microorganismos mediante su mutación deberían tener en cuenta que las bacterias y demás microorganismos que degradan los residuos sólidos ya se han adaptado para llevar a cabo este trabajo. Los cambios genéticos realizados a un microorganismo por necesidad se hacen ignorando la historia de sus genes o su evolución. Quizás existan excelentes razones que expliquen por qué un microorganismo dado no degrada más rápidamente un

compuesto determinado, o por qué una ruta catabólica no tiene un rango de sustrato más amplio. Aunque existan muchos ejemplos de modificaciones genéticas realizadas con éxito que han logrado un mejor rendimiento, se debe comenzar por obtener un conocimiento adecuado de las características intrínsecas del microorganismo original. El microorganismo ha contado con decenas, y quizás centenares de siglos de adaptación y selección, para conseguir una ruta degradadora equilibrada respecto a las restantes necesidades fisiológicas de la célula, lo cual permite que el microorganismo pueda competir en su ambiente natural. Si un investigador construye un nuevo microorganismo capaz de mostrar un metabolismo más rápido, o más completo, pero que ya no pueda competir con sus primos naturales en el ambiente, este nuevo microorganismo será inútil para la mayoría de las aplicaciones en la degradación de residuos peligrosos.

Las aproximaciones genéticas que pretenden mejorar las cepas de microorganismos degradadores se complican por el hecho de que la mayoría de los residuos peligrosos no se degradan de forma completa con una sola reacción enzimática; más bien, se requieren rutas completas de hasta cinco pasos o más para lograr una mineralización efectiva. Por lo tanto, las modificaciones genéticas encaminadas a lograr un producto enzimático deben ser compatibles con la compleja maquinaria de las rutas metabólicas completas. Una superenzima fabricada mediante mutación, no es suficiente para mejorar el rendimiento; también debe ser capaz de integrarse en un sistema vital. Además, la mayoría de las rutas degradadoras requieren una serie de cofactores y unas correctas condiciones ambientales. Esto significa que es necesario contar con microorganismos vivos y completos para degradar la totalidad, menos unos pocos, de los residuos peligrosos. Una mutación que sea muy nociva o que provoque una inestabilidad genética puede lograr todos los efectos deseados en relación a la reactividad o especificidad, pero aun así no será útil (dentro o fuera del laboratorio).

Este capítulo describe una serie de métodos, de complejidad creciente, que pueden ser empleados para modificar genéticamente los microorganismos con la esperanza de mejorar su rendimiento. En este caso, «mejorar» quiere decir modificar el rendimiento de la célula hasta llegar a lo deseado por los investigadores o los responsables de la biorrecuperación. Siempre hay que tener en cuenta que el propio microorganismo quizás no considere estos cambios como una mejora. Los medios disponibles actualmente para introducir cambios genéticos estables en los microorganismos incluyen: el uso de la mutagénesis y la selección; la conjugación y/o recombinación de las rutas o pasos en las rutas; los transposones; la clonación de genes; la ingeniería de proteínas y la mutación *in situ*.

Mutagénesis y selección

Esta discusión prestará más atención a la selección de las cepas mutantes, ya que la mutagénesis es un proceso mucho más fácil. Existen varios protocolos disponibles para la utilización de los mutágenos^{1,2}, pero siempre es difícil encontrar la mutación deseada. Las técnicas mutagénicas incluyen: la exposición a mutágenos

químicos; el uso de radiación ultravioleta; la congelación y descongelación; o sencillamente, el aprovechamiento de la frecuencia natural de mutación de los microorganismos, mutación creada por errores durante la replicación, exposición a radiaciones cósmicas, u otros factores ambientales de mutación. Existen varios tipos de mutágenos químicos que pueden provocar cambios en el genoma. Algunos agentes, tales como las bases análogas, los colorantes, las radiaciones, o los productos químicos radioactivos, pueden provocar mutaciones. Las bases análogas, como el 5-bromouracilo o la 2-aminopirina, se incorporan durante el ciclo de replicación, de esta forma provocan las mutaciones GC a AT o AT a GC. Los colorantes, como las acridinas o el bromuro de etilo, pueden causar mutaciones de cambio de fase. La radiación, como la ultravioleta o los rayos-x, provoca la formación de dímeros de pirimidina o el ataque de radicales libres sobre el ADN, ambos sucesos pueden llevar a una reparación susceptible a errores o a una supresión. Los productos químicos reactivos, como por ejemplo: la hidroxilamina, la 4-nitroquinoleína, el metanosulfonato de etilo, o el metanosulfonato de metilo, son capaces de modificar químicamente el ADN, provocando malos emparejamientos y una replicación del ADN propensa a errores.

Un mutágeno extremadamente potente es la *N*-metil-*N*-nitro-4-quinoleína, que induce a mutaciones mediante una ruta de reparación SOS propensa a errores. Un procedimiento para inducir mutaciones en la *Streptomyces* utilizando nitroquinoleína, es el siguiente: durante 20 min, se incuba con nitroquinoleína un cultivo de células ajustado a un pH 8,5, con una concentración de 100-400 µg/ml. Después se separan las células del mutágeno mediante el centrifugado o la resuspensión en un medio fresco. A continuación, los cultivos se desarrollan en un medio nutritivo y se colocan en placas para obtener varios mutantes³. Lo que hace eficaz cualquiera de estos métodos es el diseño y la implantación de una estrategia de selección que favorezca la identificación de las características deseadas, a pesar del método mutagénico empleado. Esto también es válido para la manipulación genética o mutagénesis de transposones. El éxito de cualquiera de estos métodos depende de una buena y sólida estrategia de selección.

Una de las mayores desventajas que presentan las técnicas mutagénicas sencillas es que la mayoría de las mutaciones dan como resultado un microorganismo al que, sencillamente, le falta una cierta actividad enzimática. Esto es útil si se está estudiando la cartografía genética o la estructura y función de los genes, pero la pérdida de una capacidad normalmente no se considera como una mejora para un microorganismo degradador. Las mutaciones sencillas que aceleran la velocidad global de una reacción, o las que permiten la degradación de compuestos nuevos, son mucho más raras y difíciles de seleccionar después de un tratamiento mutagénico. Un ejemplo frecuentemente utilizado, para ilustrar que pueden emplearse técnicas mutagénicas y selectoras sencillas con el fin de mejorar los microorganismos biosintéticos, es la sobreproducción de antibióticos, como la penicilina, a partir de cultivos fúngicos. Lo que se ignora son las miles de horas de trabajo manual que han sido necesarias para seleccionar de forma individual los cultivos aislados, uno tras otro, después del tratamiento mutagénico. La atracción que puede ejercer este método simple para la mejora de cepas desaparece rápidamente cuando se

calcula que costaría millones o decenas de millones de dólares en gastos de laboratorio para repetir el proceso utilizado en el aislamiento de las cepas sintetizantes de penicilina. Hacen falta técnicas selectoras más sofisticadas para aislar una cepa mejorada; estas técnicas deben emplear al personal de forma eficaz y dentro de un período de tiempo razonable.

Existen varios métodos eficaces para la selección y enriquecimiento de los mutantes defectuosos en las rutas catabólicas. Uno de los mejores depende de si la muerte de un microorganismo muestra las propiedades de una cepa salvaje. El enriquecimiento a favor de los mutantes deseados puede conseguirse provocando que las cepas salvajes formen un intermediario tóxico durante la degradación de un sustrato análogo. Un ejemplo de esto sería el uso de análogos halogenados —en particular los fluorados— de hidrocarburos aromáticos para enriquecer el medio a favor de los mutantes que son defectuosos en la degradación de moléculas naturales no halogenadas. Este método ha sido denominado *síntesis letal*; en este método, las moléculas tóxicas, como el fluorocitrato, se acumulan durante la degradación de los análogos fluorados⁴. Se ha utilizado el enriquecimiento selectivo para aislar pseudomonas defectuosas en el catabolismo de algunas moléculas, como la cimeno, con análogos fluorados⁵. Este método es tan eficaz que después del crecimiento de la *Pseudomonas putida* en presencia de 5 mM de 5-fluorosalicilato, sin ninguna mutagénesis previa, hasta el 100 por cien de los microorganismos supervivientes fueron defectuosos respecto a su capacidad para metabolizar los salicilatos. Este método también generó mutantes defectuosos con benzoatos, ftalatos, hidroxibenzoatos, y anisatos halogenados^{5,6,7}. En todos los casos, los mutantes fueron enriquecidos a partir de cultivos que no habían sido expuestos a ningún mutágeno; una vez más se ilustra la capacidad de este método para dar lugar a un enriquecimiento, con un alto grado de eficacia, en favor de los mutantes defectuosos deseados. Este tipo de selección, fuerte, y eficaz, es la forma más directa de obtener los mutantes deseados que son defectuosos en las rutas catabólicas.

Otro método selectivo que ha mostrado un alto rendimiento es el tratamiento mediante células capaces de matar a las cepas salvajes restantes, que todavía pueden crecer y después rescatar a las viables que no han crecido. Este método implica la incubación de las células en un sustrato específico junto con los organismos defectuosos, y, posteriormente, el cultivo se trata con una combinación de penicilina o ampicilina más cicloserina⁸ (Fig. 3.1). Los múltiples procesos de exposición de un cultivo a un sustrato específico añadiendo cicloserina y ampicilina para matar a las células que puedan crecer sobre este compuesto y, después, aislar y enriquecer los mutantes mediante el lavado de las células y su colocación en placas sobre otro compuesto de crecimiento, generan una alta proporción de mutantes que pueden ser aislados (hasta en varios órdenes de magnitud después de tres ciclos de enriquecimiento y aislamiento). Esta técnica es sencilla, eficaz, y muy fácil de utilizar si los microorganismos empleados son sensibles a la ampicilina o a la penicilina más cicloserina. El método más sencillo con el que se obtengan los resultados deseados, normalmente, será el mejor, y dicho método no debería ser despreciado solamente porque sea el más antiguo.

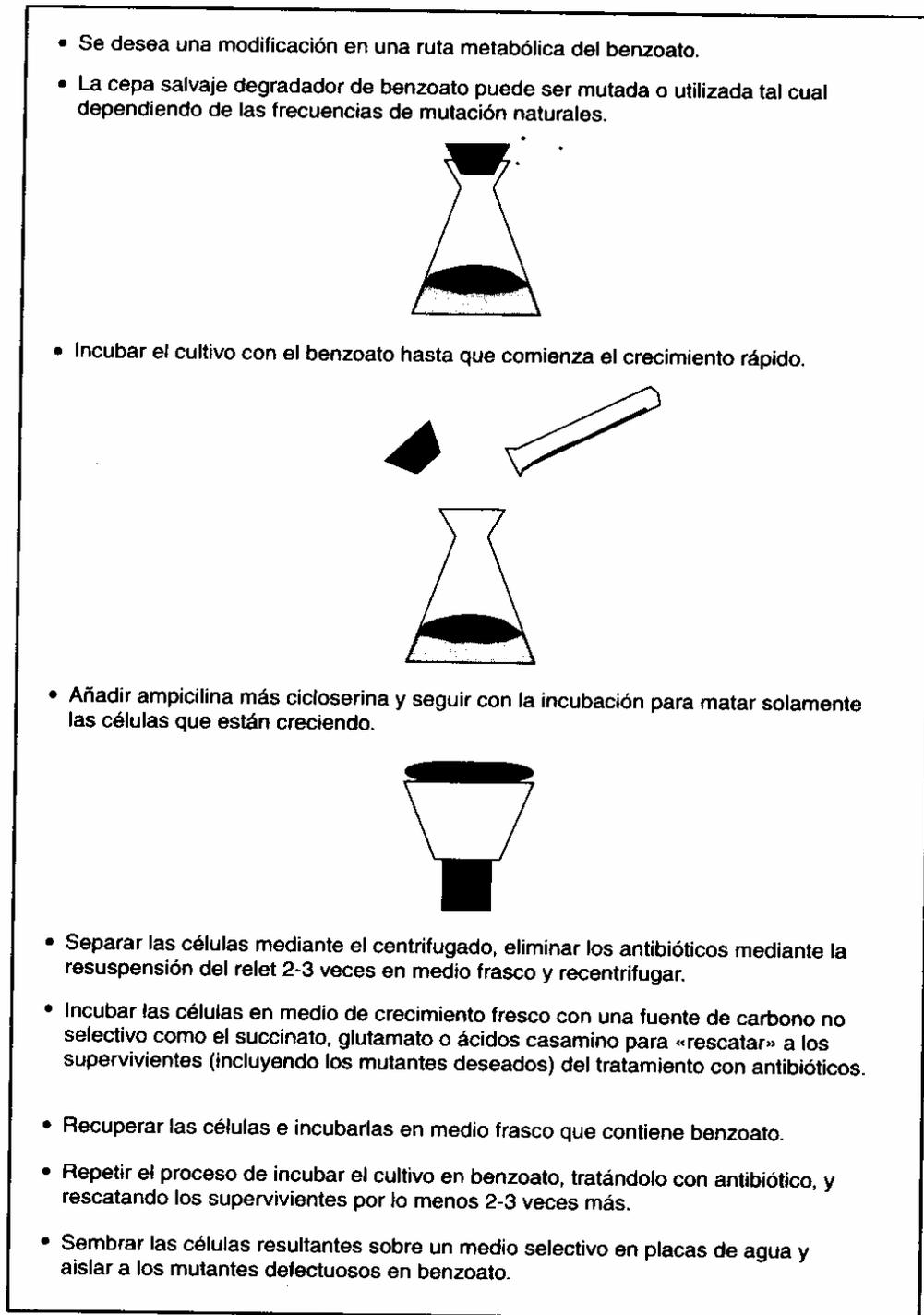


FIGURA 3.1. Enriquecimiento para obtener un mutante bloqueado.

Aunque es difícil imaginar que una mutación que origine la pérdida de una actividad dé lugar a un microorganismo con unas propiedades degradadoras mejoradas, la pérdida por mutación de la función catabólica a veces es útil en el sentido de que genera microorganismos con una gama de actividades más amplia frente a los residuos peligrosos. Se ha utilizado un microorganismo que contenía una lesión genética en la ruta de *meta*-ruptura, como punto de partida para la producción de una nueva cepa que contenía una ruta metabólica híbrida.

Las mutaciones sencillas también han sido útiles para ampliar el rango de los sustratos que pueden ser atacados por un solo microorganismo. Se ha utilizado la mutación espontánea, que provoca la aparición de una actividad fenol-oxidante, para la construcción de un microorganismo capaz de degradar una amplia gama de sustratos⁹. También se han conseguido poblaciones microbianas con mayor capacidad para degradar compuestos orgánicos clorados utilizando la mutagénesis UV aleatoria¹⁰. Además, se ha operado con éxito un dispositivo, que incluye una cámara de flujo continuo de radiación UV conectada a un biorreactor, que continuamente selecciona los microorganismos capaces de crecer a costa de los ácidos 4-clorobenzoico, 2,4-diclorobenzoico y de otros compuestos cloroorgánicos. Se ha demostrado que el método de mutagénesis UV aumenta la degradación de los compuestos orgánicos clorados mediante la introducción continua de mutaciones inducidas por la radiación UV.

La mutagénesis y selección también pueden ser utilizadas, al menos en teoría, para ampliar la especificidad del sustrato de una enzima o de una ruta degradadora completa. Una forma de mutación útil sería conseguir un microorganismo que contuviese una ruta degradadora que se sintetizase constitutivamente, en vez de estar sujeta a la inducción mediante uno o más sustratos. Muchas rutas degradadoras se muestran activas frente a sustratos que no inducen a la síntesis de la ruta degradadora en sí. Normalmente, debe haber un cosustrato presente como inductor, pero la producción de mutantes constitutivos permite que el espectro total de las capacidades metabólicas de un microorganismo actúe frente a un rango de sustratos, con o sin la presencia de un inductor. Ésta es una herramienta útil en la mutagénesis, ya que la síntesis constitutiva puede hacer superar una barrera regulatoria, lo que podría evitar que un microorganismo atacase e, incluso, creciese a costa de un rango de sustratos mucho más amplio.

Los mutantes constitutivos de las rutas degradadoras aromáticas pueden obtenerse fácilmente mediante el método descrito por Parke y Ornston¹¹. En este método, las células se cultivan de forma alterna sobre succinatos (una fuente no inductora de carbono) y sobre un compuesto encontrado en la ruta metabólica que normalmente no es sustrato de crecimiento. Durante la exposición al succinato, todas las células crecerán y surgirán mutantes espontáneos. Cuando se subcultiva en un medio que contiene un sustrato de ruta no inductor, solamente crecerán de forma inmediata los mutantes constitutivos. Si no se observa ningún crecimiento, el cultivo se traslada de nuevo al medio succinato para permitir un crecimiento adicional y la formación de nuevos mutantes espontáneos. La exposición alterna del cultivo a estos dos sustratos, al final, puede dar lugar a un mutante constitutivo. Este método también podría utilizarse para el enriquecimiento a favor de mu-

tantes constitutivos, siguiendo la mutagénesis con mutágenos químicos o transposones.

También se han desarrollado unos esquemas para aislar mutantes que tienen una especificidad inductora alterada; la maquinaria reguladora se cambia mediante mutagénesis para que las nuevas moléculas provoquen la inducción de la ruta enzimática deseada. El sistema regulador de la ruta benzoática codificada sobre el plásmido TOL se ha alterado mediante mutagénesis química para que sea inducido por el 4-etilbenzoato¹². En este caso particular, la maquinaria reguladora a favor de la ruta TOL (el promotor Pm y el gen *xy IS*) fue introducida en la misma célula mediante técnicas de ingeniería genética. El promotor Pm, en vez de regular la expresión de los genes TOL, se colocó en una posición para controlar la expresión de un gen resistente a la tetraciclina. *Escherichia coli*, que contiene este sistema genético, crecería en presencia de la tetraciclina si se añadiese al medio de cultivo un inductor de la ruta TOL, como puede ser el benzoato, pero no crecería en presencia del 4-etilbenzoato (4EB), ya que este compuesto no es un inductor del Pm. Después de colocar las células sobre placas con agar que contenían el mutágeno etilmetasulfonato y 4-etilbenzoato, se aislaron unos pocos mutantes resistentes a la tetraciclina. Algunos de estos mutantes presentaron como propiedad que el 4-etilbenzoato fuera capaz de provocar la inducción del promotor Pm. Aunque el método utilizado en este ejemplo para seleccionar un sistema de promotores 4EB-inducible dependía de técnicas de ingeniería genética, la mutación en sí se produjo por mutagénesis química sencilla.

Harker y sus colaboradores utilizaron la transposición para crear una ruta constitutiva del ácido 2,4-diclorofenoxiacético empleando el plásmido pJP4 y el transposón Tn 1721¹³. En este caso, el transposón fue insertado en el gen regulador originando la expresión constitutiva. Esta construcción se llevó a cabo con plásmidos naturales y, por lo tanto, no sería considerada como un producto de ingeniería genética.

Conjugación y recombinación naturales

La *conjugación* es un método que consiste en trasladar la información genética deseada desde un organismo a otro. Se trata de un proceso natural mediante el cual se trasladan uno o más genes desde un organismo a otro, posibilitando el emparejamiento de los dos organismos. Las bacterias son promiscuas, se aparean con facilidad, e intercambian información genética con otras especies con una frecuencia relativamente alta. Aunque no todos los plásmidos son capaces de introducirse en una nueva cepa alojadora, a veces pueden ser inducidos a hacerlo mediante la presencia de un segundo plásmido «ayudante» que codifica la transferencia del ADN del plásmido desde un microorganismo donante hasta otro receptor. Este sistema de transferencia genética es útil para introducir ADN nuevo en un huésped que ya contenga algunas de las propiedades deseables. Un microorganismo podría ser modificado mediante este método para que degradase a un rango de sustratos más amplio, o para que desarrollase nuevas actividades enzimáticas en un huésped

que ya se hubiese adaptado para sobrevivir o reproducirse en un ambiente concreto.

El proceso de conjugación es muy sencillo en el laboratorio. Normalmente, el organismo receptor se elige porque sus propiedades se acercan a las deseables, y porque muestra alguna característica según la cual podrá separarse del donante mediante selección. Uno de los métodos de selección consiste en hacer al organismo receptor resistente a un antibiótico, como por ejemplo la rifampicina; otro consiste en mutar al organismo donante para hacerle deficiente en lo que se refiere a su capacidad de sintetizar un aminoácido o nucleótido esencial. Una vez conseguido esto, el organismo que contiene el ADN deseado y el organismo receptor se mezclan sobre un filtro, un medio de cultivo, o la superficie de una placa con agar, y se deja que crezcan juntos. La masa biológica resultante se suspende, se lava y se coloca de nuevo sobre un medio que sólo permita la reproducción del organismo receptor. Si el ADN del plásmido codifica una función directamente seleccionable, como el crecimiento sobre un sustrato nuevo, el organismo receptor podrá seleccionarse posteriormente mediante el crecimiento sobre el compuesto específico (Fig. 3.2).

Los procesos de conjugación descritos aquí son eficaces para la transferencia genética de un rango muy amplio de genes transportados por plásmidos. Si es necesario un plásmido ayudante para llevar a cabo la transferencia, entonces se utilizan tres cepas diferentes en el proceso de emparejamiento: la receptora, la cepa que lleva el plásmido deseado, y la cepa que lleva el plásmido ayudante, todas ellas son emparejadas juntas. Este proceso de intercambio genético da lugar a la transferencia al receptor de la información genética deseada. La nueva cepa, conseguida mediante métodos cuasinaturales, es considerada un microorganismo natural, aunque ahora contenga propiedades que puedan ser únicas en un huésped concreto. Estas propiedades confieren al receptor una características nuevas y esperanzadoramente deseables, y son una forma muy eficaz de introducir grandes cantidades de ADN nuevo en un organismo huésped. Las cepas microbianas pueden ser construidas de forma natural mediante la movilización de genes cromosómicos y plásmidos por parte de los plásmidos conjugativos. Ésta es la técnica utilizada por Kellog et al., y mejorada por Krockel y Focht^{14,15,16}.

El uso de procesos naturales de intercambio genético, promoviendo el emparejamiento u otros mecanismos para el intercambio del ADN, puede dar lugar, en el laboratorio, a nuevas vías híbridas degradadoras sobre una gran gama de sustratos. Este método también puede descubrir nuevas clases de compuestos que sirvan al microorganismo receptor como sustratos de crecimiento. Aunque estos procesos dependan de sucesos de recombinación, o incluso de la introducción de grandes plásmidos (>100 kb) en los microorganismos, esta aproximación no se considera ingeniería genética, y por lo tanto no está estrictamente regulada por las agencias gubernamentales. Incluso cuando una cepa específica exista únicamente en el laboratorio donde haya sido producida, el uso real de este organismo en el tratamiento de los residuos peligrosos no será más restringido que el de una cepa no indígena que exista de forma natural.

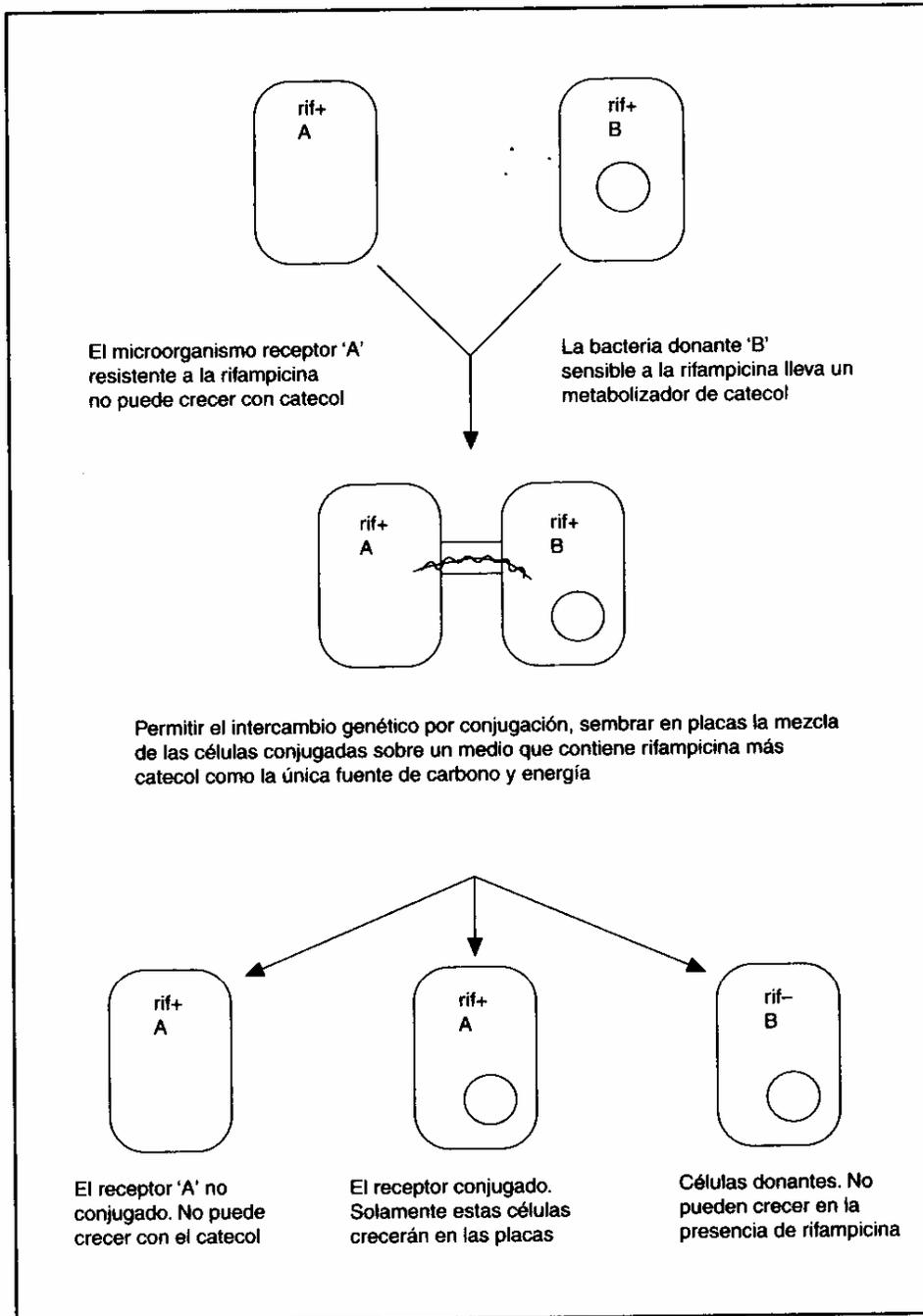


FIGURA 3.2. Transferencia por conjugación de información genética.

Algunos de los primeros ejemplos de rutas metabólicas híbridas fabricadas utilizaron el plásmido TOL introducido por conjugación. Una cepa de *Pseudomonas putida* que crezca sobre salicilatos vía formación de catecol y por vía de una ruptura en *orto* también podrá convertir al 3-metilsalicilato en 3-metilcatecol, pero no podrá crecer sobre 3-metilsalicilato porque tiene una especificidad muy alta para la ruta *orto*-ruptura. La introducción, en este cultivo, del plásmido TOL que contiene la vía de *meta*-ruptura no específica producirá un microorganismo que crecerá a costa del 3-metilsalicilato¹⁷.

Otro ejemplo de ruta híbrida generada mediante conjugación es la descrita por Reineke y Knackmuss para un microorganismo que puede atacar compuestos aromáticos halogenados^{18,19}. La cepa B13 *Pseudomonas* puede degradar algunos compuestos aromáticos clorados, como por ejemplo el 3-clorobenzoato, a través de la ruta clorocatecol. Sin embargo, otros halobenzoatos sustitutos no son sustratos para la primera enzima en esta ruta, y los intentos de mutar o seleccionar mutantes espontáneos no tuvieron éxito. Estos investigadores demostraron que una molécula como la 4-clorobenzoato podría servir como sustrato de crecimiento si la especificidad de la primera enzima de la ruta se pudiese ampliar para atacar a este compuesto, ya que el 4-clorocatecol podría ser metabolizado por el resto de la ruta y serviría como sustrato de crecimiento. Esta barrera metabólica inicial fue superada mediante la transferencia del plásmido TOL, la codificación de una benzoato dioxigenasa, y su conjugación en la cepa receptora *Pseudomonas* B13. Después de la selección, se aislaron las células receptoras que dependían de la benzoato dioxigenasa TOL-codificada para su crecimiento con el 4-clorobenzoato, como única fuente de carbono y energía.

La investigación descrita en el párrafo anterior es un ejemplo excelente del uso de la conjugación y selección posterior para mejorar las propiedades de un microorganismo activo frente a los residuos peligrosos recalcitrantes, como pueden ser los compuestos orgánicos halogenados.

Un trabajo anterior con *Pseudomonas* sp. cepa B13 había mostrado la inestabilidad estructural de los plásmidos TOL degradadores, después de la conjugación en *Pseudomonas putida*. La introducción del plásmido, mediante su apareamiento, en un fondo bioquímico nuevo dio lugar a cambios estructurales en el ADN, lo que originó un plásmido nuevo que crecería con un sustrato de *m*-metil benzoato y produciría derivados que a su vez crecerían a costa del sustrato 4-clorobenzoato²⁰.

Estos experimentos de conjugación también causaron grandes cambios estructurales en el ADN que codificaba la ruta TOL degradadora. Los plásmidos originales sufrieron una gran regresión, lo que originó cambios en el fenotipo regulador permitiendo el crecimiento con el 4-clorobenzoato. Estos experimentos demuestran la naturaleza plástica del ADN; se pueden provocar grandes cambios en la especificidad del sustrato e incluso la estructura del ADN por el mero hecho de introducir un trozo de ADN en un nuevo microorganismo. Como este proceso tiene lugar en la naturaleza todos los días, no es sorprendente que existan múltiples rutas enzimáticas relacionadas para la degradación de compuestos orgánicos.

Mutagénesis de transposones

Los *transposones* son unidades del ADN, de diverso tamaño y complejidad, que pueden «saltar» a varios lugares en un genoma bacteriano. Parece ser que los transposones se autoinsertan en secuencias del ADN combinando funciones que son codificadas por los propios transposones²¹. Los transposones y otros elementos de la secuencia de inserción tienen características en común. Los términos de estas unidades de ADN llevan repeticiones invertidas de 10 a 40 pb, que se piensa que sirven como puntos de reconocimiento para las enzimas de transposición (como, por ejemplo, las transposasas). Estas repeticiones flanquean una zona central que contiene un número determinado de genes que codifican las funciones de transposición y otros marcadores seleccionables. La inserción en un genoma bacteriano viene acompañada por una duplicación del ADN. Los transposones son capaces de integrarse mediante la recombinación en cualquier número de secuencias del ADN extraño (a falta de cualquier homología aparente de ADN).

La ventaja que ofrecen los transposones a la modificación genética de los microorganismos degradadores de residuos peligrosos, es su capacidad para reordenar el ADN. Los transposones gestionan fusiones, duplicaciones, regresiones, inversiones, y la adición de nuevos genes. Todas estas acciones pueden modificar, y con suerte mejorar, el rendimiento de los microorganismos utilizados para degradar los residuos peligrosos. Los transposones han sido muy útiles para el estudio de la función y estructura de los genes; y algunas rutas metabólicas de hidrocarburos, como el sistema TOL, son llevadas sobre transposones^{22,23}. Los genes catabólicos del plásmido TOL también han sido localizados y caracterizados mediante la mutagénesis de transposones.

Otra ruta metabólica que emplea transposones incluye a la ruta catabólica del clorobenzoato que utiliza el transposon Tn5271. Éste permite el crecimiento del organismo huésped sobre 3- y 4-clorobenzoato²⁴. Además, se moviliza en un rango de diferentes bacterias huéspedes durante la adaptación comunitaria a la presencia de 4-cloroanilina, un contaminante común industrial y agrícola²⁵. Los genes de la clorobenceno dioxigenasa de la cepa P51 *Pseudomonas* también son utilizadas con un elemento transposable, Tn5280²⁶. El hecho de que las funciones catabólicas puedan ser transportadas por transposones, como en este caso, puede ser un mecanismo que posibilite su diseminación en el ambiente cuando está presente un sustrato apropiado, como por ejemplo un clorobenceno. Un informe reciente indica que los genes que codifican la degradación del naftaleno utilizan un transposon defectuoso, denominado Tn4655²⁷.

La inserción de un transposón es un suceso catastrófico para un gen estructural cuando éste es el lugar de inserción. Como los transposones normalmente son grandes piezas de ADN, su inserción en cualquier gen estructural provoca la destrucción íntegra de ese gen y la pérdida completa de su función. Además, los transposones pueden tener efectos polares sobre el resto del operón. Es decir, la inserción de un transposon no solamente inactiva un gen estructural, sino que también, a menudo, bloquea la transcripción de cualquier otro gen que dependa del mismo elemento promotor. Esta característica es muy útil para el estudio de las relaciones

estructura-función y del orden genético en una serie de genes más allá de un promotor dado. Esto viene ilustrado en el siguiente ejemplo. Un promotor P controla la síntesis de cinco genes en el orden A, B, C, D, y E. La inserción de un transposón en el gen E provocaría la pérdida funcional de tan sólo el gen E (Fig. 3.3). Una inserción transposonal en el gen B causaría la pérdida funcional de los genes B, C, D, y E. De esta forma, un grupo de mutantes de transposones, uno o más en cada gen del operón, identificaría el orden génico en este operón.

Los transposones tienen otros usos, además de servir para la inactivación de genes y el estudio de la estructura genética. Una de las ventajas de la mutagénesis de transposones es el hecho de que se produce con una frecuencia relativamente alta, de 10^{-3} a 10^{-6} por célula²⁸. Además, las mutaciones transposonales son sucesos naturales, y los productos derivados de su utilización no son considerados por las agencias reguladoras como manipulados mediante ingeniería genética. Sin embargo, hay que tener en cuenta la siguiente advertencia. Un método frecuentemente utilizado para introducir transposones en una célula consiste en la transferencia de un plásmido, éste lleva el transposón a la célula receptora. Si el plásmido (no el

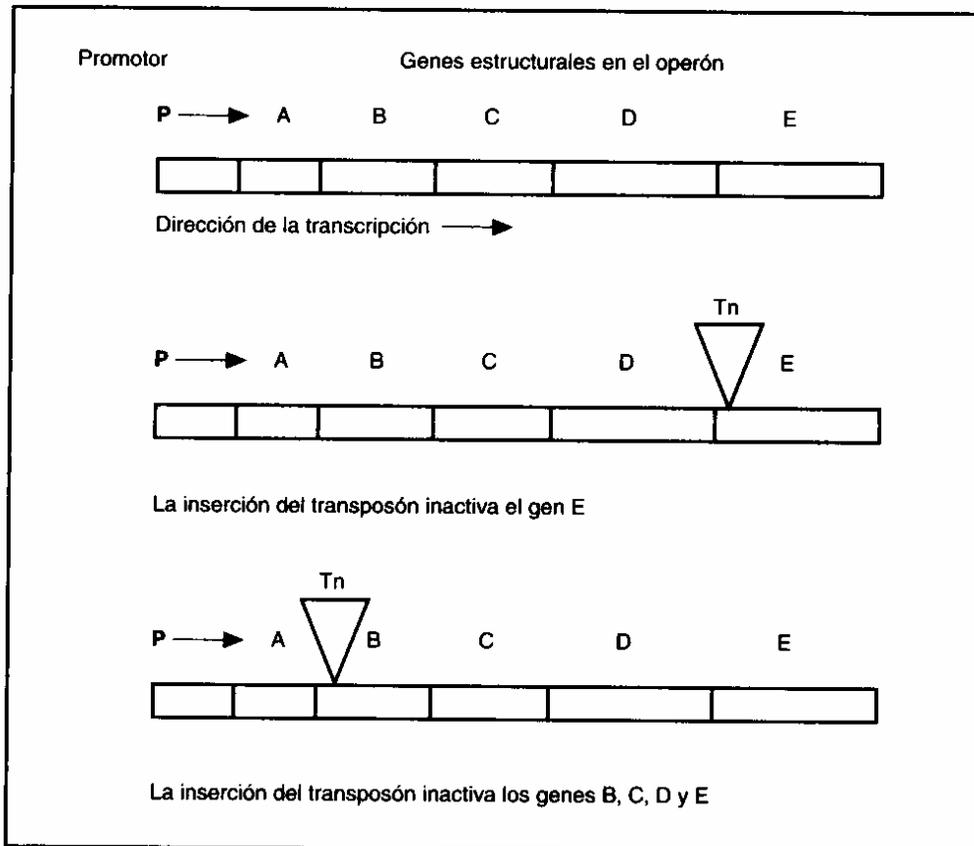


FIGURA 3.3. Cartografía de transposones de un operón.

transposón) ha sido objeto de cualquier actividad de ingeniería genética, como la clonificación de genes o mutagénesis *in situ*, el mutante transposonal resultante puede ser considerado por EPA como manipulado genéticamente, incluso aunque el propio plásmido no pueda ser replicado dentro de la célula mutada. Por lo tanto, si se está planificando el uso de un transposón para generar una cepa con mejores propiedades respecto a la degradación de residuos sólidos, y se desean evitar problemas reglamentarios y gastos, se debe elegir un sistema de entrega de transposones y plásmidos que no contenga información producida por ingeniería genética.

Una ventaja importante de la mutagénesis transposonal y del uso de transposones como elementos de transferencia genética es la simplicidad de los experimentos implicados. Aunque se produzcan con una frecuencia relativamente alta, los sucesos de transposición son lo suficientemente raros como para precisar del diseño de una estrategia de selección del genoma transpuesto. Una característica que presentan la mayoría de los transposones es que contienen algún tipo de marcador seleccionable, como por ejemplo: la resistencia a los antibióticos, la resistencia a los metales pesados, o una función genética positiva. Normalmente, un transposón puede ser introducido en una célula receptora mediante conjugación utilizando un plásmido transportador. Como es mucho más eficaz examinar solamente los microorganismos que realmente han sufrido un suceso de transposición, el plásmido que transporta el transposón, con frecuencia, puede ser manipulado de alguna forma para que la célula receptora lo pierda. Por lo tanto, después de la selección, cualquier célula que contenga el marcador seleccionable transportado sobre el transposon debe haber padecido un suceso transposicional. Una forma de llevar a cabo esto consiste en utilizar un plásmido cuya maquinaria replicadora sea sensible a la temperatura. El plásmido crece en las células donantes a una temperatura permisiva, y se transfiere, mediante conjugación, a una célula receptora que, posteriormente, crece a una temperatura que no permite la replicación del plásmido. Al final de este ciclo de selección, cualquier célula que todavía lleve el marcador seleccionable sobre el transposón habrá pasado por un suceso transposicional.

Unas pocas de estas células tendrán un transposón insertado en, o cerca del, gen de interés, a menos que este transposón solamente se inserte en un lugar o unos pocos lugares sobre el cromosoma de la célula receptora. Un experimento típico, para la mutación o inserción transposicional del ADN en una pseudomona receptora u otro microorganismo degradador de hidrocarburos, sería el siguiente. Una *E. coli*, capaz de aparearse con la *Pseudomona* receptora, se transforma mediante un plásmido que lleva un transposón. El transposón lleva también un marcador seleccionable, como por ejemplo, una resistencia a la tetraciclina. El plásmido, aunque sea capaz de ser transferido mediante conjugación a la *Pseudomona* receptora, no puede replicarse en ese huésped. A continuación, la *E. coli* donante se aparea con la *Pseudomona* receptora. Después de aparearse, los organismos se ponen en placas que contienen un material que tan sólo permite el crecimiento de la *Pseudomona*, como por ejemplo un medio mínimo que contenga una fuente de carbono aromático. Como el plásmido de *E. coli* no puede replicarse dentro de la *Pseudomona*, la selección del marcador llevado sobre el transposón, por ejemplo: resistencia a la tetraciclina (esto presupone que la *Pseudomona* no era resistente a

la tetraciclina), produce un grupo de colonias de *Pseudomonas* que ahora llevan el transposón, o bien en alguna parte del cromosoma, o bien insertado en un plásmido que ya estaba en la célula.

Este tipo de experimento es una forma sencilla de llevar a cabo una serie de sucesos genéticos complicados. Un gran fragmento de ADN nuevo, que contenga uno o varios genes, puede ser insertado en alguna parte del genoma de un receptor elegido. Cuando se produce la inactivación por inserción de un gen, se procede a llevar a cabo aún más ciclos de selección. La selección en busca de la pérdida de una función genética, a la vez que se utiliza el marcador seleccionable llevado sobre el transposón, puede provocar el aislamiento de uno o más microorganismos que lleven el transposón en el gen de interés.

Además de la inactivación catastrófica de genes estructurales, que apenas si es útil para aplicaciones comerciales, los transposones pueden alterar el ADN de otras formas que presentan un potencial mucho mayor en lo que se refiere a aplicaciones ambientales. Como los transposones pueden contener varios genes estructurales que codifiquen una resistencia a los antibióticos, funciones transposonales, y otras actividades no caracterizadas, los promotores de estos genes pueden ejercer su influencia más allá de los confines del ADN del propio transposon. Los promotores llevados por transposones pueden provocar la transcripción de genes estructurales más allá del punto de inserción. Tal hecho puede haber acontecido en un microorganismo recientemente presentado, que normalmente degrada al contaminante común tricloroetileno (TCE), después de su crecimiento en presencia de sustratos aromáticos como el tolueno o el fenol. Este microorganismo muestra la síntesis constitutiva de las enzimas implicadas en la degradación del TCE después de someterse a una mutagénesis transposonal²⁹.

La mayoría de las funciones naturales de los transposones, con la posible excepción de algunas actividades como las del plásmido TOL, no están directamente relacionadas con la degradación de los residuos peligrosos, pero algunas pueden mejorar la capacidad de una cepa huésped de sobrevivir en un ambiente nuevo. Estas funciones genéticas llevadas por los transposones incluyen la resistencia a los metales pesados. Un organismo huésped que lleve tal resistencia, teóricamente, podrá desarrollar sus funciones en un ambiente nuevo donde los metales puedan ser inhibitorios o letales para la cepa huésped original. Un ejemplo de esto es el transposon Tn501³⁰.

Un inconveniente que la mutagénesis transposonal comparte con otros mecanismos naturales de mutación es que, por definición, se trata de un suceso aleatorio. Una mutación deseada es relativamente rara, y casi nunca existe una base racional a favor del uso de este tipo de mutágeno para mejorar el rendimiento. Si se requieren múltiples mutaciones para una vía metabólica completa con el fin de conseguir las nuevas características deseadas, puede que sea imposible desde un punto de vista práctico crearlas utilizando métodos naturales de mutagénesis. Una ventaja fundamental del uso de transposones u otros mutágenos naturales es que el proceso es muy sencillo de realizar, y las agencias regulatorias ven favorablemente el uso de estos productos. Ésta no es una razón de peso para los estudios de laboratorio o los cultivos elaborados en un proceso restringido de fabricación. Sin

embargo, el tratamiento de residuos peligrosos casi invariablemente requerirá un uso ambiental de los microorganismos. La emisión al medio ambiente de microorganismos que no hayan sido alterados de una forma «natural» todavía implica un alto nivel de supervisiones reglamentarias y de gastos añadidos, lo que en ocasiones hace que unos cambios genómicos menos controlados sean una alternativa más práctica.

Además de interrumpir la función de los genes y, a veces, provocar la síntesis constitutiva de las enzimas deseadas, otra de las actividades de los transposones les convierte en vehículos muy atractivos para modificar los genomas bacterianos. Un transposón, por su naturaleza, introduce los genes, acompañados de las secuencias de inserción, en el cromosoma o plásmidos residentes de la célula receptora. Los transposones, por lo tanto, pueden ser utilizados para entregar información genética a un nuevo huésped. En el contexto de la degradación de residuos peligrosos, la mayoría de los transposones tienen un potencial natural limitado respecto a incrementar la especificidad de una ruta enzimática o añadir nuevas funciones metabólicas deseables. Por lo tanto, esta atractiva característica de los transposones sólo puede ser utilizada eficazmente si se rebasa la línea que separa el uso de métodos mutagénicos naturales y el uso de tecnología de ingeniería genética. Se puede utilizar cualquier técnica moderna de la biología molecular para insertar un gen nuevo en un transposón, alterar la estructura genética del propio transposón o, incluso, cambiar las propiedades del plásmido que introduce el transposón en la célula. En este caso, se considera que el microorganismo modificados resultante contiene material manipulado mediante ingeniería genética, y será regulado más estrictamente que una cepa obtenida de forma «natural».

Un vez superado o justificado este compromiso práctico, los transposones son herramientas muy útiles para la ingeniería genética. Recientemente se ha descrito una nueva serie de transposones que pueden ser utilizados para la mutagénesis insercional, para funciones de sondeo del promotor, y también, para añadir nuevas capacidades genéticas al cromosoma de un microorganismo huésped³¹. Estos transposones han sido modificados mediante ingeniería genética para que contengan genes capaces de especificar una resistencia a los antibióticos, como por ejemplo la kanamicina o el cloramfenicol, y contengan un lugar único de clonificación acompañado de las secuencias de repetición invertida del Tn5. Algunos derivados también contienen genes estructurales sin promotor, como por ejemplo: *lacZ*, *LuxAB*, o *xyIE*, que pueden utilizarse para identificar diversas funciones promotoras. Estos transposones están localizados en un plásmido que se replica solamente en algunas cepas particulares de *E. coli*, pero que puede ser apareado en un gran número de microorganismos receptores. El propio plásmido donador también ha sido manipulado mediante ingeniería genética para proporcionar las funciones de transposición necesarias para el «salto» del transposón. Este plásmido móvil transporta el transposón al receptor, donde se pierde el plásmido de replicación deficiente y su función de transposasa asociada. El transposón lleva un marcador seleccionable para que los receptores desarrollados bajo selección sólo contengan el transposón, habiendo perdido el plásmido sus funciones de transposición, de esta forma, el transposón ahora permanecerá «pegado» en su nueva localización.

Estos transposones ya han sido utilizados para introducir nuevas funciones genéticas que amplíen la especificidad de la vía metabólica en la especie B13 *Pseudomonas*, de forma que sea posible la degradación de sustratos adicionales con un solo microorganismo. Con el fin de ampliar el rango degradador del organismo receptor para que éste incluya al 4-clorobenzoato, se utilizó un derivado del transposón Tn5 manipulado genéticamente que contenía genes del plásmido TOL codificado toluato 1,2-dioxigenasa (*xyiD*), dihidroxiciclohexadieno carboxylato dehidrogenasa (*xyiL*), y el regulador positivo *xyiS*³².

Técnicas de biología molecular

A lo largo de los últimos quince años han surgido varias técnicas que implican una manipulación del ADN, y que permiten la modificación deliberada de uno o más genes sobre plásmidos o cromosomas de microorganismos. Estas aproximaciones han sido utilizadas intencionadamente para mejorar las propiedades deseables de algunos microorganismos de uso industrial, principalmente en la manufactura de productos terapéuticos humanos. Otras aplicaciones incluyen la modificación de los microorganismos utilizados en la agricultura y la fabricación de pesticidas, además de las plantas que han sido manipuladas mediante ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética se encuentran entre las herramientas más poderosas disponibles para mejorar las características de los microorganismos.

Aunque, por definición, los procesos de biología molecular son menos aleatorios y generan resultados más predecibles, el inconveniente principal que presentan estos métodos es la estricta regulación que existe actualmente respecto al uso en el ambiente de microorganismos manipulados por ingeniería genética (MIGs). Las emisiones ambientales, que incluyen a la mayoría de las aplicaciones de degradación de residuos peligrosos, están sometidas a largos exámenes por parte de EPA (USA) y otras agencias estatales y locales. El uso ambiental de los MIGs también presenta una gran resistencia a nivel local y nacional por parte de los sectores críticos profesionales de la ingeniería genética, y por parte de los grupos de ciudadanos preocupados porque estos productos pudiesen ejercer un impacto adverso sobre la salud y el ambiente. Actualmente, las ventajas de utilizar métodos que den lugar a cambios definidos, racionales y predecibles en el genoma de un microorganismo, que favorezcan la degradación de residuos peligrosos, no han sido demostradas en el trabajo de campo. Hasta la fecha, no se ha realizado ningún ensayo real para degradar residuos peligrosos con organismos manipulados genéticamente. Como probablemente esta situación cambiará en el futuro, a continuación se presenta una descripción de la utilidad de estas técnicas para construir nuevos y mejorados microorganismos degradadores de residuos peligrosos.

Cualquier modificación genética para mejorar una cepa comienza por un cambio en el ADN que codifica un solo gen. Este cambio puede implicar que se introduzca una pareja de nucleótidos mediante una mutación aleatoria, sin embargo la técnica de mutagénesis dirigida disponible conlleva una aproximación racional y diseñada para la modificación del material genético. Las mutaciones introducidas

en los genes reguladores pueden provocar la síntesis constitutiva de las enzimas deseadas, o provocar la inducción de una ruta degradadora mediante un nuevo estímulo. Una mutación en una secuencia promotor también puede dar lugar a unos altos niveles de expresión genética. Las mutaciones en los genes estructurales pueden cambiar la velocidad de una reacción enzimática o provocar cambios en la estabilidad o en la vida media de una enzima. Los cambios que afectan a las actividades de enlace del sustrato de las proteínas catalizadoras pueden ampliar también la especificidad del sustrato, y provocar que una enzima pueda mostrar actividad en una ruta biodegradadora frente a un rango amplio de sustratos, mejorando de esta forma su utilidad. Todos estos cambios pueden hacerse (al menos teóricamente) mediante mutagénesis aleatoria, sin embargo, si se conoce la secuencia de ADN que codifica una enzima o una ruta degradadora, entonces, se pueden introducir cambios racionales en el diseño de estas enzimas o rutas metabólicas. Estas nuevas propiedades pueden ser extremadamente difíciles o imposibles de generar utilizando técnicas más tradicionales.

La mutagénesis *in situ* ya ha sido utilizada para incrementar la estabilidad de una enzima comercial (la subtilisina proteasa). Se introdujeron varias mutaciones en el gen estructural que codifica la subtilisina, provocando que la nueva proteína mostrase una vida diez veces más larga a temperaturas elevadas y en presencia de detergentes o agentes oxidantes, como por ejemplo una lejía^{33,34}. La información disponible sobre la estructura activa de esta proteína hizo posible que los investigadores pudiesen proponer una serie de cambios en su arquitectura, lo que provocaría un aumento de su estabilidad. Su hipótesis fue correcta; mediante algunos cambios, se produjo un aumento de la estabilidad de la proteína de hasta un orden de magnitud. La estabilidad es una característica deseable, tanto para las enzimas industriales como para las implicadas en la degradación de residuos peligrosos, ya que una larga vida enzimática en ambientes adversos es una de las características de rendimiento requeridas para las aplicaciones ambientales, aunque la enzima normalmente se encuentre dentro de la célula y el ambiente aquí no sea tan adverso.

La mutagénesis dirigida específicamente al nucleótido se puede emplear para llevar a cabo sustituciones, supresiones e inserciones de bases. Los métodos para realizar este tipo de mutagénesis se describen detalladamente en un volumen reciente, *Methods in Enzymology*³⁵. Se han diseñado métodos que utilizan genes replicados en un vector plasmídico e incluso en un fago como el M13³⁶. El uso del fago M13 permite la utilización de un proceso sencillo para la introducción de mutaciones. La mutagénesis se produce cuando una hebra sencilla de ADN M13, que contiene un gen replicado, se mezcla con un pequeño oligonucleótido que se hibrida en la región de mutación deseada. El pequeño oligonucleótido habrá sido sintetizado para que contenga la mutación deseada y una región homóloga. Este oligonucleótido mutante todavía hibridará el ADN de hebra única salvaje, y se emplearán técnicas clásicas para rellenar la hebra de ADN restante. Este proceso genera una copia del gen salvaje y una copia de un gen localizado en el sitio deseado (Fig. 3.4). Los genes también pueden ser llevados por plásmidos antes del paso de mutagénesis, pero el ADN de doble hebra debe convertirse en uni-hebra

antes de introducir la mutación deseada. Se han desarrollado métodos para obtener una alta cosecha de mutantes utilizando ADN de plásmido de doble hebra³⁷.

Una desventaja de la mutagénesis dirigida, mencionada con frecuencia, es que después del suceso de mutagénesis, con suerte, la mitad del ADN lleva la mutación deseada, y, de hecho, normalmente apenas la mitad del ADN se ha mutado. Unas frecuencias de mutación extremadamente bajas pueden ser resultado de unas reacciones *in vitro* ineficaces, y también de un fenómeno de la expresión heterodúplex que favorece la secuencia original a costa de los mutantes³⁸. La dificultad de obtener la mutación deseada después de la mutagénesis dirigida, requiere el establecimiento de una serie de procedimientos subsiguientes de selección de colonias similares para el aislamiento de los mutantes generados aleatoriamente.

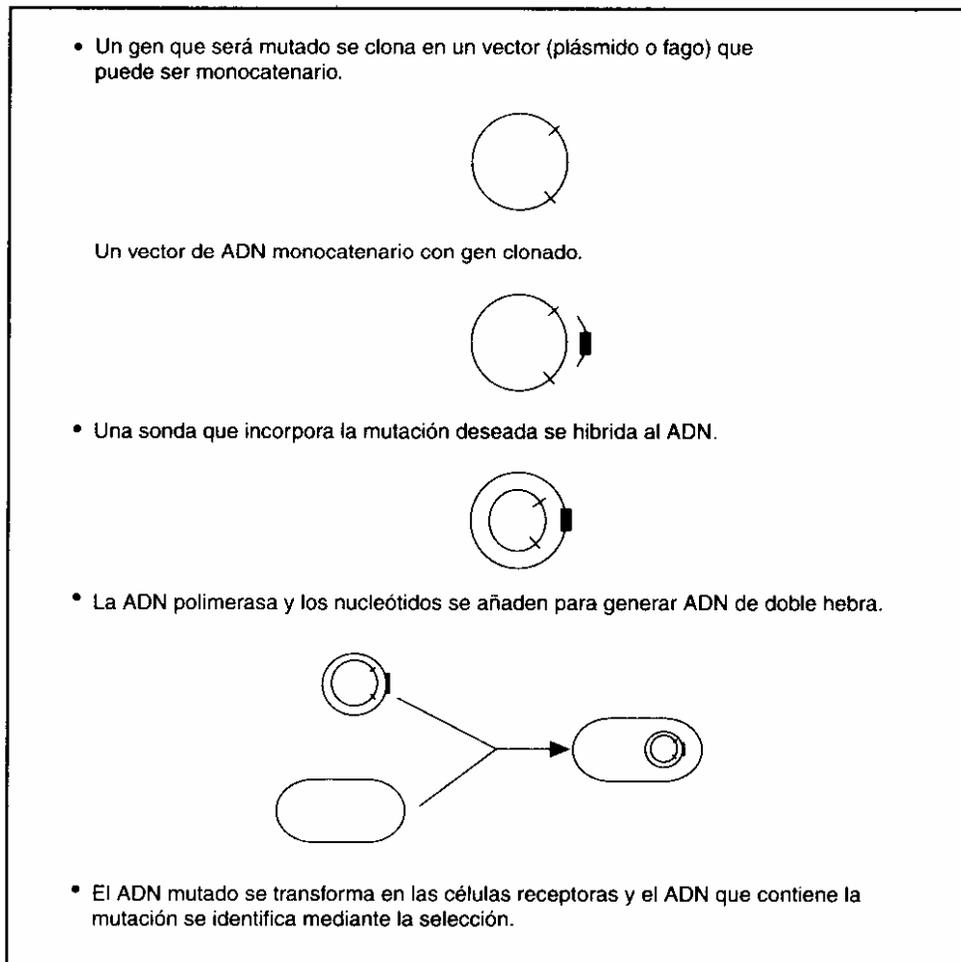


FIGURA 3.4. Mutagénesis dirigida.

Se puede utilizar una aproximación racional a la mutagénesis dirigida para generar mutantes con una alta frecuencia, e incluso se pueden aislar mutantes que no muestren un fenotipo seleccionable. Este tipo de mutagénesis dirigida, que favorezca al mutante y sea muy eficaz, se puede realizar mediante el uso, como patrón, de bacterias que sintetizan un ADN que contiene uracilo. El gen que va a ser mutado se replica en ADN plásmido o fago M13, y se transfiere a un huésped *E. coli* al que le faltan las enzimas dUTPasa (*dut*) y glicosidasa uracilo (*ung*). Estas mutaciones provocan que el ADN celular contenga uracilo en vez de timina. El ADN patrón que contiene uracilo se recupera desde estas células y se mezcla con nucleótidos salvajes, una primera sonda que contendrá la mutación lugar-específica deseada, y ADN polimerasa. Esta reacción provocará la síntesis de una segunda hebra de ADN que contendrá timina y la mutación específica deseada, ya que la hebra nueva se sintetiza utilizando la primera sonda. Al final de la reacción, habrá una mezcla de dos tipos de ADN: el ADN no mutado que contiene uracilo y que fue utilizado como patrón al principio de la reacción, y el ADN que contiene timina y que lleva la mutación lugar-específica. La mezcla de ADN se transfiere después a un *E. coli* tipo salvaje. Como este *E. coli* tiene la enzima dUTPasa, el ADN que contiene uracilo se destruye, pero se retiene el ADN mutado que contiene timina³⁹.

Las mutaciones dirigidas son útiles para diversas aplicaciones más allá del incremento de la actividad enzimática. La mutagénesis dirigida también ha sido utilizada para alterar la especificidad del sustrato. El reconocimiento de la subtilisina por parte del sustrato también se ha alterado mediante mutagénesis lugar-dirigida^{40,41}. Realizando cambios en uno o más aminoácidos en el lugar activo de la subtilisina, podría modificarse radicalmente la forma de reconocimiento para la separación del enlace peptídico de esta enzima. Mediante este método se recolectaron diferentes subtilisinas, cada una reactiva preferencialmente respecto a su serie particular de sustratos polipeptídicos. Algunos de estos cambios provocaron una hidrólisis muy rápida de los sustratos, que normalmente son muy poco reactivos con la subtilisina. Este método de mutagénesis dirigida muestra el valor práctico de esta técnica; se pueden introducir unos cambios precisos en una proteína para provocar su reacción con una gama más amplia de, o de diferentes, sustratos. La modificación de la especificidad del sustrato, de las enzimas que degradan residuos peligrosos, permitirá que la misma enzima o ruta degradadora ataque a una gama de sustratos más amplia. Esto siempre será importante para la degradación de residuos peligrosos, ya que la contaminación con compuestos puros es muy rara; la mayoría de los lugares contienen mezclas de muchos compuestos distintos. Si se pudiese utilizar un solo microorganismo para degradar la mayor parte, o todos, los residuos peligrosos en un lugar determinado, este tipo de alteración llegaría a ser extremadamente útil, y reduciría de forma importante el coste de generar y aplicar biomasa en la degradación de residuos peligrosos. En el futuro, la mutagénesis dirigida llegará a ser una herramienta ampliamente utilizada para la mejora de las enzimas activas frente a los residuos peligrosos.

Con el advenimiento de una nueva técnica, denominada *reacción cadena-polimerasa* (RCP), para la replicación *in vitro* del ADN, se ha presentado un método

nuevo y altamente controlado para la introducción de mutaciones en genes clonados^{42,43}. Los ingredientes para una RCP incluyen: un gen clonado que servirá como ADN patrón; una serie de nucleótidos que serán utilizados para construir ADN nuevo; sondas oligonucleótidas que servirán para «promover» la reacción, y serán sintetizadas de tal forma que, al menos una de las sondas, se hibridará en el lugar de mutación y llevará las secuencias mutadas; y una enzima ADN-polimerasa termosensible. Los participantes de la reacción se mezclan, se calienta la reacción para separar el ADN patrón, y las sondas oligonucleótidas (incluyendo las que contienen la mutación) se hibridan con el ADN patrón y dirigen la síntesis hacia una nueva hebra de ADN. Esta nueva hebra de ADN contendrá la mutación deseada. Como estas hebras de síntesis nueva se convertirán ahora en patrones para la siguiente ronda de síntesis, el ADN mutado rápidamente llegará a suponer el mayor producto de la RCP. Al final de los ciclos de amplificación existe una alta proporción de ADN mutado para su clonación, aislamiento y caracterización posterior.

Una de las aplicaciones más importantes de las técnicas de biología molecular consiste en su utilización para transferir uno o más genes desde un organismo a otro. Esta transferencia genética puede introducir nuevas capacidades metabólicas en el organismo receptor. Los métodos de clonación han llegado a ser casi rutinarios durante los últimos quince años. Existen descripciones sobre experimentos de clonación para algunos genes sencillos implicados en la degradación de pesticidas⁴⁴ y conjuntos enteros de genes que codifican la degradación de moléculas complejas, como por ejemplo hidrocarburos aromáticos o bifenilos policlorados (PCBs)⁴⁵. Estos métodos son fáciles de utilizar pero requieren una cierta experiencia en las técnicas de laboratorio de biología molecular.

Con frecuencia, la introducción de uno o unos pocos genes en un microorganismo puede usarse para ampliar de forma importante sus capacidades degradadoras. A menudo, una ruta de poca utilidad para la degradación de residuos peligrosos puede ser mejorada mediante la introducción de un solo gen que codifique una enzima «entrada» con una especificidad mucho más amplia. Esto ha sido demostrado mediante una serie de experimentos en el laboratorio de K. N. Timmis, donde se han construido microorganismos capaces de degradar a una amplia gama de aromáticos clorados⁴⁶. Las técnicas de clonación de genes siguen un protocolo relativamente sencillo, especialmente si el gen en cuestión confiere una propiedad deseada, como, por ejemplo, el crecimiento sobre un nuevo sustrato. Un microorganismo que contenga el/los gen/es de interés se hace crecer en un medio, y el ADN se recupera mediante uno de los métodos que se encuentran en el manual *Cold Spring Harbor*⁴⁷. Después, el ADN se «corta» o se digiere mediante diversas enzimas contadoras. Los fragmentos de ADN se clonan en un plásmido o fago utilizando ligasa de ADN, con el fin de introducir el ADN digerido en un vector de ADN digerido de forma similar (el plásmido-ADN o fago que ha sido utilizado para introducir el gen clonado en un nuevo huésped). El organismo huésped se «transforma» ahora con el ADN recombinante, y los individuos que han sido alterados con éxito mediante este método se identifican mediante técnicas de aislamiento y selección, o técnicas de crecimiento.

Estos organismos, ahora, contendrán un ADN nuevo y funcional que confiere al microorganismo receptor una serie de propiedades únicas y deseadas, y provoca que estas células sean etiquetadas como «manipuladas por ingeniería genética». El material genético introducido puede codificar un gen sencillo o varios en una ruta completa. Las nuevas propiedades pueden incluir la capacidad de degradar moléculas recalcitrantes o difíciles de tratar. Una de las primeras patentes, sobre un microorganismo manipulado mediante ingeniería genética, describía a un organismo que contenía múltiples rutas catalizadoras capaces de degradar los compuestos del petróleo crudo⁴⁸.

Las técnicas para el clonado de genes ofrecen algunos métodos que no están disponibles a partir de otros sistemas de alteración genética. Mediante el uso de la clonación, se pueden someter rutas bioquímicas completas a la influencia de promotores y sistemas reguladores que permitan que la ruta se active o desactive mediante la adición de un inductor específico o un cambio en las condiciones de cultivo. La posibilidad de modificación de las rutas reguladoras o degradadoras puede ser una ventaja importante si el residuo peligroso no es inductor de la ruta degradadora, o bien, si el residuo aún es peligroso a concentraciones por debajo de las necesarias para provocar la inducción de la ruta. Una regulación alterada también podría ayudar a la degradación de los compuestos que no sirven como fuentes de carbono o energía para el crecimiento de un organismo. Existen plásmidos, denominados *vectores de expresión*⁴⁹, que llevan una fuerte secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción en uno o más lugares de clonificación. Se puede transferir un gen o una serie de genes de una ruta biodegradadora a un lugar de clonación, y regularse mediante un fuerte promotor. Las secuencias promotoras nativas llevadas sobre el ADN clonado, en ocasiones, pueden provocar la expresión constitutiva de la actividad enzimática degradadora en la nueva célula huésped.

Estos dos métodos han sido descritos en la literatura científica relativa al tema. Los genes que codifican la oxidación de compuestos aromáticos, como el naftaleno, originan una actividad enzimática mayor que la salvaje en *E. coli* si se utiliza el promotor *lac* en el plásmido pUC para digerir la expresión⁵⁰. El conjunto de genes que codifican la tolueno-monooxigenasa también ha sido introducido en vectores de expresión. Las células que llevan los vectores recombinantes degradan tolueno y TCE después de la inducción térmica o química del promotor híbrido.⁵¹ Se han introducido en un plásmido de alto grado de replicación los genes que codifican la ruta para la degradación de ciertos PCBs, y las células que llevan este vector muestran una síntesis constitutiva de la actividad degradadora del PCB⁴⁵.

Los genes de tolueno-dioxigenasa de *Pseudomonas putida* F1 han sido secuenciados y clonados en vectores de expresión *E. coli*⁵². En el momento de inducción se comprobó que la enzima expresada tenía un gran rango de sustratos, incluyendo compuestos tan distintos como: tolueno, fenol, cresol, clorobenceno, diclorobenceno, xileno, naftaleno, bifenilo, y algunos mono- y diclorobifenilos, así como TCE⁵³.

En algunos casos, la cantidad de una enzima o de las enzimas presentes en el ambiente limita la velocidad de degradación de los residuos peligrosos. Los genes que codifican la actividad degradadora pueden ser clonados, con un alto número

de copias (30 o más por célula), más allá del fuerte promotor llevado sobre un plásmido. Esto puede provocar una sobreexpresión de los genes degradadores, provocando una alta presencia de enzimas degradadoras en las células. Las técnicas de biología molecular y bioquímica han sido mejoradas hasta el punto que pueden lograr que el 40 por ciento de la proteína total de una célula pueda estar en una sola molécula⁵⁴. Un organismo que contenga tantas enzimas quizás no sea práctico para las aplicaciones ambientales, ya que habrá tanta energía celular dedicada a la síntesis de una proteína que no quedará mucha para degradar los residuos. Una amplificación genética más modesta, que produzca la ruta metabólica deseada presentando una importante actividad enzimática en la célula, podría acelerar radicalmente la velocidad de degradación de los residuos tóxicos en aquellos ambientes en los que el nivel de enzimas es lo que limita la velocidad del proceso.

El uso de métodos modernos de RCP en microbiología ambiental trae consigo nuevas ventajas asociadas a las técnicas de biología molecular. Recientemente, han sido descritas en microbiología una serie de aplicaciones para la ampliación del ADN mediante RCP⁵⁵. Las aplicaciones ambientales específicas de la ampliación genética mediante RCP son: el uso de este método para detectar la presencia de microorganismos en muestras ambientales, y el uso de los métodos RCP para seguir la dispersión y supervivencia de microorganismos modificados genéticamente⁵⁶. La ampliación mediante RCP puede emplearse para detectar los microorganismos indígenas que puedan servir como indicadores de la contaminación química o biológica desde algunas fuentes, como por ejemplo, aguas residuales no tratadas.

El método RCP también puede ayudar en la clonación de los genes o secuencias de genes parcialmente caracterizados. La ampliación del ADN mediante RCP ha sido utilizada para aislar genes directamente desde ambientes naturales⁵⁷, y los métodos RCP pueden utilizarse también para ampliar el ADN con una información de secuencia limitada⁵⁸.

Estos métodos RCP enfatizan el papel creciente de la tecnología en las técnicas de biología molecular. Esta tecnología está continuamente desarrollando nuevos y más potentes métodos para la clonación, manipulación y expresión genética. Estas tecnologías, que cambian y avanzan rápidamente, alterarán la forma de abordar los problemas de biorrecuperación, la calidad de los biocatalizadores disponibles para los investigadores y profesionales de esta actividad, y mejorarán las posibilidades de limpieza en las zonas contaminadas con residuos peligrosos recalcitrantes.

Referencias bibliográficas

1. Hopwood, D. A., 1970, The Isolation of Mutants. In J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in Microbiology*, Vol. 3A, Academic Press, New York, pp. 363-433.
2. Carlton, B. C., and B. J. Brown, 1981, Gene Mutation. In P. Gerhardt (ed.), *Manual of Methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 222-242.

3. Baltz R. H., 1986, Mutagenesis in *Streptomyces* spp. In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, A. L. Demain and N. A. Solemon (eds.), pp. 184-189.
4. Peters, R. A., 1952, Croonian Lecture. Lethal Synthesis. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 139:143-167.
5. Wigmore, G. J., and D. W. Ribbons, 1981, Selective Enrichment of *Pseudomonas* Spp. Defective in Catabolism after Exposure to Halogenated Substrates, *J. Bacteriol.* 146:920-927.
6. Wigmore, G. J., and D. W. Ribbons, 1980, *p*-Cymene Pathway in *Pseudomonas putida* Selective Enrichment of Defective Mutants by Using Halogenated Substrate Analogs, *J. Bacteriol.* 143:816-824.
7. Shira, K., 1986, Screening of Microorganisms for Catechol Production from Benzene, *Agric. Biol. Chem.* 50:2875-2880.
8. Ornston, L. N., Ornston, M. K., Chow, G., 1969, Isolation of Spontaneous Mutant Strains of *Pseudomonas putida*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36:179-184.
9. Ribbons, D. W., and P. A. Williams, 1982, Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals: Diversity of Genetic and Biochemical Traits of *Pseudomonads*. In Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, A. Hollaender (ed.), Plenum Press, New York, pp. 211-232.
10. Kai, G., A. S. Weber, and W. C. Ying, 1991, Use of Continuous Flow LTV-Induced Mutation Technique to Enhance Chlorinated Organic Biodegradation, *J. Ind. Microbiol.* 8:99-106.
11. Parke, D., and L. M. Ornston, 1976, Constitutive Synthesis of Enzymes in the Protocatechuate Pathway and of the β -Ketoacid Uptake System in Mutant Strains of *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.* 126:272-281.
12. Ramos J. L., and K. N. Timmis, 1987, Experimental Evaluation of Catabolic Pathways of Bacteria, *Microbiol. Sci.* 4:228-237.
13. Harker, A., R. H. Olsen, and R. J. Seidler, 1989, Phenoxyacetic Acid Degradation by the 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (TFD) Pathway of Plasmid pJP4: Mapping and Characterization of the TFD Regulatory Gene, *tfdR*, *J. Bacteriol.* 171:314-320.
14. Kellogg, S. T., D. K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty, 1981, Plasmid Assisted Molecular Breeding: New Technique for Enhanced Biodegradation of Persistent Toxic Chemicals, *Science* 214:1133-1135.
15. Krockel, L., and D. D. Focht, 1987, Construction of Chlorobenzene-Utilizing Recombinants by Progenitive Manifestation of a Rare Event, *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2470-2475.
16. Adams, R. H., C. M. Huang, F. K. Higson, V. Brenner, and D. D. Focht, 1992, Construction of a 3-Chlorobiphenyl-Utilizing Recombinant from an Intergeneric Mating, *Appl. Environ. Microbiol.* 58:647-654.
17. Nakazawa, T., and T. Yokota, 1977, Isolation of a Motant TOL Plasmid with Increased Activity and Transmissibility from *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.* 129:39-46.
18. Reineke, W., and H. J. Knackmuss, 1979, Construction of Haloaromatics Utilizing Bacteria, *Nature* 277:285-286.
19. Reineke, W., and H. J. Knackmuss, 1980, Hybrid Pathway for Chlorobenzoate Metabolism in *Pseudomonas* sp. B13 Derivatives, *J. Bacteriol.* 142:467-473.
20. Jeenes, D. J., W. Reineke, H.-J. Knackmuss, and P. A. Williams, 1982, TOL Plasmid pWWO in Constructed Halobenzoate-Degrading *Pseudomonas* Strains: Enzyme Regulation and DNA Structure, *J. Bacteriol.* 150:180-187.
21. Bukhari, A., J. A. Shapiro, and S. Adhyal, (eds.), 1977, DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 782 pp.

22. Tsuda, N., and T. Iino, 1987, Genetic Analysis of a Transposon Carrying Toluene Degrading Genes on a TOL Plasmid pWWO, *Mol. Gen. Genet.* 210:270-276.
23. Nakazawa, T., S. Nouye, and A. Nakazawa, 1980, Physical and Functional Mapping of RP4-TOL Plasmid, Recombinants: Analysis of Insertion and Deletion Mutants, *J. Bacteriol.* 144:222-231.
24. Nakatsu, C., J. Eng, R. Singh, N. Straus, and C. Wyndham, 1991, Chlorobenzoate Catabolic Transposon Tn5271 is a Composite Class 1 Element with Flanking Class 2 Insertion Sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8312-8316.
25. Fulthorpe, R. R., and R. C. Wyndham, 1992, Involvement of a Chlorobenzoate-Catabolic Transposon, Tn5271, in Community Adaptation to Chlorobiphenyl, Chloroaniline and 2,4-dichlorophenoxy Acetic Acid in a Fresh Water Ecosystem, *Appl. Environ. Microbiol.* 58:314-325.
26. Dan Rur Mer, J. R., A. J. B. Zehender, and W. M. DeVoss, 1991, Identification of a Novel Composite Transposable Element, Tn5280, Carrying Chlorobenzene Dioxygenase Genes of *Pseudomonas* sp. Strain P51, *J. Bacteriol.* 173:7077-7083.
27. Tsuda, M., and T. Iino, 1990, Naphthalene Degrading Genes on Plasmid NAH7 are on a Defective Transposon, *Mol. Gen. Genet.* 223:33-39.
28. Franklin, N. C., 1978, Genetic Fusions for Operon Analysis, *Annu. Rev. Genet.* 12:193-221.
29. Shields, M. S., 1991, Construction of a *Pseudomonas cepacia* Strain Constitutive for the Degradation of Trichloroethylene and Its Evaluation for Field and Bioreactor Conditions, Abstracts, Annual Meeting, American Society for Microbiology, K-8, May 15-18, New Orleans, Louisiana, p. 576.
30. Stanisih, V. A., P. M. Bennett, and M. H. Richmond, 1977, Characterization of a Translocation Unit Encoding Resistance to Mercuric Ions That Occurs on a Nonconjugative Plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 129:1227-1233.
31. DeLorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. M. Timmis, 1990, Mini-Tn5 Transposon Derivatives for Insertion Mutagenesis, Promotor Probing and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria, *J. Bacteriol.* 172:6568-6572.
32. Timmis, K. M., F. Rojo, and J. L. Ramos, 1988, Prospects for Laboratory Engineering of Bacteria to Degrade Pollutants. In *Environmental Biotechnology*, G. S. Omenn (ed.), Plenum Press, New York, pp. 61-79.
33. Narhi, L. O., Y. Stabinski, N. Levitt, L. Miller, R. Sachdev, S. Finley, S. Park, C. Kolvenbach, T. Aurakawa, and M. Zukowski, 1991, Enhanced Stability of Subtilisin by Three Point Mutations, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13:12-24.
34. Zukowski, M., Y. Stabinski, L. Narhi, J. Mauck, M. Stowers, and M. Fiske, 1990, An Engineered Subtilisin with Improved Stability: Applications in Human Diagnostics. In *Genetics in Biotechnology of Bacilli*, Vol. 111, M. N. Zukowski, A. T. Ganesan, and J. A. Hoch (eds.), Academic Press, New York, pp. 162-193.
35. Wu, R., and L. Grossman, 1987, *Methods of Enzymology*, Vol. 154, Academic Press, New York.
36. Zoller, M. J., and M. Smith, 1982, Oligonucleotide-Directed Mutagenesis Using M13-Derived Vectors: An Efficient and General Procedure for the Production of Point Mutations in Any Fragment of DNA, *Nucl. Acid Res.* 10:6487-6500.
37. Y. Morinaga, T. Franceschini, S. Inouye, and M. Inouye, 1984, *Bio/Technology* 7:636-639.
38. Hemsley, A., N. Arnheim, M. D. Toney, G. Cortopassi, and D. J. Galas, 1989, A Simple Method for Site-Directed Mutagenesis Using the Polymerase Chain Reaction, *Nucleic Acids Research.* 17:6545-6551.

39. Kunkel, T. A., 1985, Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis without Phenotypic Selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492.
40. Wells, J. A., B. C. Cunningham, T. P. Grayear, and D. A. Estelle, 1987, Recruitment of Substrate Specificity Properties from One Enzyme into a Related One by Protein Engineering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5157-5174.
41. Wells, J. A., D. B. Bowers, R. R. Bott, T. P. Graycar, and D. A. Estelle, 1987, Designing Substrate Specificity by Protein Engineering of Electrostatic interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1219-1223.
42. Mullis, K. B., 1990, The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction, *Sci. Am.* 262(4):56-65.
43. Mullis, K. B., and F. A. Faloona, 1987, Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction, *Methods Enzymol.* 155:335-351.
44. Serdar, C. M., D. C. Murdock, and M. F. Rohde, 1989, Parathionhydrolase Gene from *Pseudomonas diminuta* MG: Subcloning, Complete Nucleotide Sequence, and the Expression of the Mature Portion of the Enzyme in *Escherichia coli*, *Bio / Technology* 7:1151-1155.
45. Mondello, F. J., 1989, Cloning and Expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* Strain LB400 Genes Encoding Polychlorinated Biphenyl Degradation, *J. Bacteriol.* 171:1725-1732.
46. Timmis, K. N., F. Rojo, and R. J. Ramos, 1988, Prospects for Laboratory Engineering of Bacteria to Degrade Pollutant. In *Environmental Biotechnology: Reducing Risks from Environmental Chemicals through Biotechnology*, G. S. Omenn (ed.), Plenum Press, New York, pp. 61-79.
47. Maniatis T., E. F. Frisch, and J. Sanbrook, 1982, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
48. Chakrabarty, A. M., 1981, Microorganisms Having Multiple Compatible Degradative Energy Generating Plasmids and Preparation Thereof. U.S. Patent 4,259,444.
49. Burnette, W. N., V. L. Marr, and W. Cieplak, 1988, Direct Expression of Bordetella Pertussis Toxin Sub-Units to High Levels in *Escherichia coli*, *BiolTechnology* 6:699-706.
50. Ensley, B. D., T. D. Osslund, M. Joyee, and M. J. Simond, 1988, Expression and Complementation of Naphthalene Dioxygenase Activity in *Escherichia coli*. In *Microbial Metabolism and the Carbon Cycle*, S. R. Hagedorn, R. S. Hanson, and D. A. Kunz (eds.), Harwood Academic, New York, pp. 437-455.
51. Winter, R. B., K. M. Yen, and B. D. Ensley, 1989, Efficient Degradation of Trichloroethylene by a Recombinant *Escherichia coli*, *Bio / Technology* 7:282-285.
52. Zylstra, G. J., and D. T. Gibson, 1989, Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* Fl: Nucleotide Sequence of the *tolCIC2BADE* Genes and Their Expression in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 264:14940-14946.
53. Zylstra, G. J., L. P. Wackett, and D. T. Gibson, 1989, Trichloroethylene Degradation by *Escherichia coli* Containing the Cloned *Pseudomonas putida* Fl Toluene Dioxygenase Genes, *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3162-3166; Zylstra, G. J., and D. T. Gibson, 1991, Aromatic Hydrocarbon Degradation: A Molecular Approach. In J. K. Setlow (ed.), *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vol. 13, Plenum Press, New York, pp. 183-203.
54. Fiescko, J., and T. Rich, 1986, Production of Human Alpha Consensus Interferon in Recombinant *Escherichia coli*, *Chem. Eng. Commun.* 45:229-240.
55. Steffan, R. J., and R. M. Atlas, 1991, Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology, *Annu. Rev. Microbiol.* 45:137-161.

56. Chaudhry, G. R., G. A. Torazos, and A. R. Bhatti, 1989, Novel Method for Monitoring Genetically Engineered Microorganisms in the Environment, *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1301-1304.
57. Paul, J. H., L. Cazares, and J. Thurmond, 1990, Amplification of the *rbcl* Gene from Dissolved and Particulate DNA from Aquatic Environments, *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1963-1966.
58. Kalman, M., E. T. Kalman, and M. Cashel, 1990, Polymerase Chain Reaction (PCR) with a Single Specific Primer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167:504-506.

Capítulo 4

BIORREACTORES

Piero M. Armenante

*Departamento de Ingeniería Química, Química y Ciencias Ambientales
New Jersey Institute of Technology
Newark, New Jersey*

Un *biorreactor* puede definirse como un depósito en el que se producen una serie de reacciones biológicas llevadas a cabo por los microorganismos o enzimas que se encuentran dentro del mismo. En el tratamiento de los residuos peligrosos, urbanos o industriales, los biorreactores se emplean principalmente para reducir la concentración de los contaminantes presentes en las aguas residuales afluentes, hasta que se consigan unos niveles aceptables. El tratamiento biológico parece ser muy versátil y rentable cuando la concentración de contaminantes en las aguas residuales es relativamente baja y los volúmenes a tratar son grandes, de esta forma, resulta poco atractivo el uso de otras alternativas de tratamiento, como, por ejemplo, la incineración.

Las aguas residuales normalmente contienen algunos contaminantes que deben ser separados, o al menos reducidos en su concentración de una forma significativa. Estos contaminantes pueden clasificarse de la forma siguiente:

- Materiales flotantes inmiscibles (p. ej., aceites, sólidos flotantes).
- Sólidos en suspensión.
- Materiales orgánicos no peligrosos solubles.
- Materiales peligrosos solubles.
- Materiales inorgánicos solubles (p. ej., amoníaco y nitratos, fósforo).
- Materiales volátiles.

La elección de la secuencia de tratamientos específicos a desarrollar dependerá del tipo y concentración de los contaminantes. Por lo general, la práctica común

consiste en clasificar los procesos de tratamiento de aguas residuales en tres categorías, es decir, tratamiento primario, secundario y terciario⁵. El *tratamiento primario* consiste en la separación de los materiales fácilmente aislables, como, por ejemplo: aceites, sólidos flotantes, o sólidos de rápida sedimentación, y la preparación del agua residual (p. ej., ajuste del pH) para tratamientos posteriores. El tratamiento primario implica operaciones como: homogeneización, neutralización, sedimentación, separación del aceite y flotación. El *tratamiento secundario* normalmente es la parte más importante del proceso, y se emplea fundamentalmente para separar el grueso de los sólidos en suspensión, los materiales orgánicos (peligrosos y no peligrosos), y otros materiales solubles. El *tratamiento terciario*, que implica procesos como la filtración con arena, ósmosis inversa, absorción y electrodiálisis, se utiliza (si es necesario) para separar cualquier contaminante residual que no haya sido eliminado durante los procesos de tratamiento anteriores.

Lo normal es elegir el tratamiento biológico durante el tratamiento secundario de las aguas residuales. Los microorganismos utilizados durante el proceso de tratamiento, normalmente, serán capaces de reducir de forma significativa el contenido en contaminantes, utilizándolos como fuente de energía y nutrientes, o receptores de electrones durante la respiración. Existen varios métodos para determinar la concentración de contaminantes, y son de uso habitual en los sectores industriales. Los más comunes son: la *demanda biológica de oxígeno* (DBO), método introducido originalmente por la Comisión Real Británica para la Evacuación de Aguas Residuales, en 1898, y la *demanda química de oxígeno* (DQO)¹⁴. Las estimaciones realizadas mediante estos métodos son bastante generales, pero ofrecen una idea aproximada del material oxidable y biológicamente degradable presente en el agua. Normalmente, se analiza también la presencia de algunos otros compuestos en las aguas residuales; estas mediciones incluyen: fósforo total, nitrógeno total y sólidos totales en suspensión. El tratamiento biológico se emplea de forma rutinaria para reducir la DBO desde 100-250 hasta 5-15 mg/l, la DQO desde 200-700 hasta 15-75 mg/l, el fósforo desde 6-10 hasta 0,2-0,6 mg/l, el nitrógeno desde 20-30 hasta 2-5 mg/l, y los sólidos en suspensión desde 100-400 hasta 10-25 mg/l⁵. Además, ya es casi común la práctica de analizar el agua para determinar su contenido en aquellos contaminantes que son prioritarios para EPA⁵⁰. Estos contaminantes son muy difíciles de tratar biológicamente, al menos en las plantas de tratamiento convencionales, y probablemente, una parte importante de las cantidades separadas en estas plantas, realmente se separa mediante arrastre por aire y adsorción en vez de utilizarse la oxidación biológica¹⁴. Por otra parte, durante los últimos años se ha demostrado que algunos microorganismos específicos son capaces de atacar y mineralizar muchos de los materiales peligrosos que antes se pensaba que no eran degradables biológicamente^{33,46}. Esto también puede tener un impacto sobre el diseño de los reactores, ya que cada tipo de microorganismo puede precisar una serie de requisitos distintos para realizar bien su actividad degradadora.

En general, el objetivo principal que se pretende alcanzar con el uso de biorreactores es la generación de un ambiente óptimo para que la actividad biológica pueda realizarse a gran escala, además deberán cumplirse también los requisi-

tos de calidad (en términos de concentración de contaminantes residuales) y cantidad (en términos de velocidad de flujo) impuestos para el agua tratada y vertida. Por lo tanto, los biorreactores destinados al tratamiento de aguas residuales sólo podrán diseñarse de forma apropiada si se tienen en cuenta los parámetros cinéticos asociados (al menos) a las principales reacciones biológicas implicadas en el proceso, tales como: la velocidad de eliminación de los contaminantes por unidad de biomasa; la velocidad de crecimiento de los microorganismos; la producción de biomasa por unidad de sustrato consumido; y los requisitos de nutrición de los microorganismos. Además, el diseñador deberá disponer de información cuantitativa en relación a la velocidad de transferencia de la masa de los nutrientes (especialmente oxígeno) a los microorganismos, con el fin de elaborar un diseño que satisfaga todos los balances de masas y energéticos del sistema. Todos estos datos se obtienen normalmente mediante experimentos en laboratorios o plantas-piloto, o bien, a partir de las experiencias acumuladas en la operación de las plantas existentes.

Hay que poner un cuidado especial a la hora de interpretar y utilizar los datos procedentes de ensayos a pequeña escala, ya que los efectos del cambio de escala pueden llegar a ser significativos durante el diseño de las instalaciones a gran escala. Por ejemplo, el tiempo de mezcla necesario para homogeneizar completamente el contenido de un fermentador de 5 l mediante un agitador, es una serie de órdenes de magnitud menor que el tiempo correspondiente necesario para mezclar completamente el contenido de un reactor de 500 m³ (suponiendo una velocidad constante del agitador), incluso si los dos sistemas cuentan exactamente con las mismas proporciones geométricas. En términos numéricos, si el tiempo de mezcla en el tanque de 5 l es de 50 s, se podrá esperar un tiempo de unos 40 min. para el reactor de 500 m³. Es evidente que esto puede tener un efecto importante, entre otras cosas, sobre la distribución y disponibilidad de los nutrientes clave, para todos los microorganismos, especialmente si los nutrientes se alimentan en un solo punto del reactor.

Este ejemplo ilustra que diferentes aspectos del proceso (en este caso, tiempo de mezcla y tamaño del reactor) de aumento de escala deben realizarse teniendo en cuenta distintas reglas. Si éste no fuese el caso, sería suficiente con ensayar un proceso a pequeña escala en el laboratorio y, después, sencillamente, agrandarlo a la escala necesaria. Además, en este ejemplo la ingeniería, como disciplina, no existiría. De hecho, un aumento a escala bien realizado requiere un conocimiento de las normas de cambio de escala apropiadas para el proceso, y la implicación de ingenieros en todos los aspectos del diseño de la planta.

Clasificación de los sistemas de reactores biológicos

Antes de examinar las características de cualquier biorreactor específico sería conveniente considerar las diferentes categorías en las que pueden clasificarse los biorreactores. Esto ayudará a comprender las ventajas e inconvenientes de cada tipo de reactor.

Reactores anaerobios frente a aerobios

La diferencia fundamental entre ambos tipos de reactores consiste en que los primeros deben cerrarse para excluir al oxígeno del sistema, ya que el oxígeno podría interferir en el metabolismo anaerobio. Una excepción importante es la constituida por los estanques anaerobios y el fondo de los estanques facultativos, en este caso, las condiciones anaerobias se establecen como consecuencia de la estratificación y reducción del oxígeno en la parte inferior del estanque. Otra razón que obliga al cierre de los reactores anaerobios es el olor asociado a la fermentación anaerobia. Un reactor anaerobio debe contar también con un sistema de ventilación o recogida para separar los gases (fundamentalmente metano y dióxido de carbono) generados durante la anaerobiosis.

Por el contrario, los reactores aerobios que contienen biomasa en suspensión casi siempre requieren el uso de un sistema de aireación o difusores para proporcionar oxígeno a los microorganismos. Una de las principales deficiencias del oxígeno como sustrato clave es su baja solubilidad en agua (unas 10 ppm a temperatura ambiente), al contrario que los restantes sustratos importantes (p. ej., glucosa, nitratos), que presentan unas concentraciones de saturación mucho más altas. Además y debido a la baja variación de la concentración del oxígeno (en las condiciones más favorables, igual a la diferencia entre la concentración en saturación y la concentración real en agua), la fuerza motriz para transferir al agua la masa de oxígeno procedente de las burbujas de aire es bastante pequeña. Por lo tanto, hay que generar una gran interfase aire-agua para suministrar suficiente oxígeno al sistema. Generalmente, esto se lleva a cabo mediante el uso de uno o más agitadores que rompen las grandes burbujas de aire y las distribuyen por el líquido, con un gasto importante de energía.

La mayoría de las plantas de tratamiento biológico existentes son aerobias. Las razones para esta preferencia frente a los sistemas anaerobios son: la mayor gama de aguas residuales que pueden ser tratadas mediante este sistema; la mayor estabilidad que presenta el proceso y la facilidad de su control; y la capacidad de conseguir un mayor grado de eliminación de DBO, nitrógeno y fósforo. Como el metabolismo se lleva a cabo más lentamente, los sistemas anaerobios requieren un mayor tiempo de residencia del residuo en el reactor. Esto se traduce en la necesidad de un reactor de mayor volumen para tratar la misma cantidad de residuos. El metabolismo lento implica también la necesidad de un mayor período de tiempo para que los organismos anaerobios colonicen el reactor. Todo ello sugiere que el tiempo de arranque puede ser importante, y que se requerirá más tiempo para volver a poner el reactor en funcionamiento cuando se pierda población bacteriana por un fallo en el proceso. Los organismos anaerobios necesitan además un mayor control de los parámetros operativos, como por ejemplo: temperatura y pH.

Mientras la degradación aerobia normalmente se lleva a cabo con múltiples organismos que trabajan más o menos de forma independiente y paralela, los organismos anaerobios viven en consorcios o asociaciones, donde distintos tipos de organismos son responsables de la realización de pasos únicos en el proceso de degradación. Esto provoca que los reactores anaerobios sean más propensos a los

fallos. Las razones que explican este hecho son la sobrecarga hidráulica, orgánica o tóxica del reactor⁵. La sobrecarga hidráulica en reactores continuos se produce cuando la velocidad de flujo demasiado alta expulsa la población microbiana del reactor. Esto tiene lugar especialmente en los casos en los que la población se reproduce lentamente, como sucede en los sistemas anaerobios. Este problema puede minimizarse mediante una inmovilización, tal y como se describe más detalladamente a continuación. La sobrecarga orgánica se produce cuando las aguas residuales contienen una alta concentración de compuestos orgánicos. Esto provoca la rápida producción de una cantidad importante de ácidos volátiles por parte de uno de los tipos intermedios de organismos anaerobios del consorcio (las bacterias acetogénicas), y la inhibición de los metanógenos (organismos últimos que actúan en un consorcio metanogénico), con el consiguiente fallo del reactor. Los compuestos tóxicos también pueden inhibir la actividad de los metanógenos o provocar su muerte, lo que ocasionará el fallo del reactor.

Sin embargo, los procesos anaerobios tienen sus propias ventajas. En general, son capaces de tolerar mayores velocidades de carga, no requieren un alto gasto energético para la dispersión del aire (como sucede en el caso aerobio), y generan menos biomasa por unidad de residuos degradados. Es más, gracias a que carecen de una importante fase de gas, los reactores anaerobios son más adecuados para tratar flujos contaminados con materiales peligrosos volátiles que, de otra forma, podrían ser arrastrados del líquido por el gas introducido.

Uno de los principales inconvenientes del uso de procesos aerobios, por ejemplo, el proceso con fangos activados, es la alta producción volumétrica de biomasa. Estos fangos normalmente se tratan de forma anaerobia para reducir su volumen e incrementar su estabilidad. Bajo condiciones idóneas, el metabolismo anaerobio generalmente da lugar a una producción de metano que puede utilizarse como combustible. Además, recientemente se ha demostrado que los organismos anaerobios presentan unas capacidades de degradación únicas, por ejemplo, pueden deshalogenar por procesos de reducción compuestos altamente recalcitrantes, que con posterioridad podrían tratarse de forma aerobia. Esto parece ofrecer un gran potencial para el tratamiento de los contaminantes peligrosos que EPA considera prioritarios, una gran cantidad de los cuales son clorados^{8,46}.

La respiración anaerobia (que utiliza un anión inorgánico, como sulfato o nitrato, como receptor de electrones en vez de oxígeno) también se puede utilizar para llevar a cabo una serie de reacciones degradadoras específicas, como por ejemplo, la desnitrificación (conversión del nitrato en nitrógeno molecular), si se mantienen las condiciones apropiadas en el reactor.

Reactores continuos frente a discontinuos

La mayoría de los sistemas de tratamiento de aguas residuales a gran escala son operados de *modo continuo*, es decir, el flujo de residuos entra continuamente en la planta y el flujo aclarado sale de forma continua. Éste es un requisito común, especialmente si los residuos se generan de forma continua. Un concepto importante asociado a los reactores continuos es el *tiempo de residencia*, definido como

el tiempo medio que un elemento fluido permanece en el reactor²⁹. Numéricamente, el tiempo de residencia τ se define como la relación entre el volumen del reactor V y el caudal Q :

$$\tau = \frac{V}{Q}$$

Cuanto mayor sea el tiempo de residencia, mayor será el tiempo medio que el agua residual permanecerá en el reactor. Esto también implica que, para una velocidad de flujo determinada, el volumen del reactor se incrementará en proporción directa al tiempo de residencia necesario para el tratamiento de los residuos.

Si no existen fluctuaciones en la alimentación o problemas en el proceso, un sistema continuo debe tratar todos los residuos entrantes para los que fue diseñado. Además, la concentración de contaminantes, biomasa, o nutrientes, debe ser constante en cualquier localización específica dentro del sistema, y no variar en función del tiempo. En otras palabras, el sistema funciona en condiciones de estado estacionario. En la práctica, las fluctuaciones siempre están presentes por los cambios que se producen en las condiciones operativas (p. ej., variabilidad en la composición de la alimentación y velocidad de flujo), y en los parámetros de operación (p. ej., fluctuaciones diarias y estacionales de la temperatura). El problema principal con los sistemas continuos es que si se produce una parada en el proceso que no se pueda corregir satisfactoriamente, el resultado será la descarga de un fluido que no cumplirá los requisitos deseados.

Por el contrario, en los *sistemas discontinuos*, el reactor se carga con los residuos y el proceso se desarrolla hasta que se completa. Esto concede al usuario la ventaja de poder seguir la evolución del proceso y decidir cuándo se ha conseguido una descontaminación adecuada del material antes de su vertido. Además, los sistemas discontinuos generalmente son más sencillos, requieren un equipo de apoyo mínimo. Son adecuados para el tratamiento de pequeñas cantidades de residuos. Los reactores discontinuos también se usan, por necesidad, cuando el tiempo de residencia requerido por la reacción de descontaminación es extremadamente largo, o bien, cuando se tratan sólidos. Éste sería el caso del compostaje, por ejemplo, en el que la descomposición de los residuos se logra mezclando los residuos con agentes espesantes y nutrientes en pilas de residuos sólidos. El tratamiento líquido/sólido, proceso similar al proceso continuo de fangos activados a gran escala, funciona mejor de forma discontinua⁹. Sin embargo, los procesos discontinuos requieren más personal, y la presencia de instalaciones de almacenamiento para los residuos entrantes mientras se realiza el proceso de tratamiento en el reactor. Esto hace que los procesos discontinuos no sean prácticos para las operaciones a gran escala.

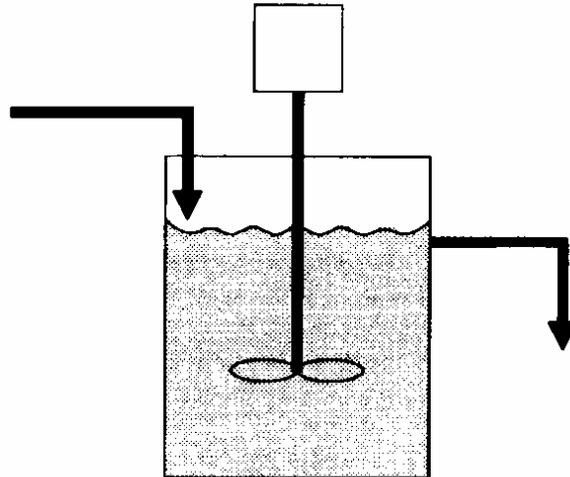
Un método de operación intermedio, entre los procesos continuos y discontinuos, es el *proceso semi-continuo*, aquí el material residual entra continuamente en un reactor, que es operado de forma discontinua. Una vez completado el proceso de detoxificación, se vacía el reactor y se inicia de nuevo el proceso. En el tratamiento de aguas residuales se emplea este método ampliamente en procesos

escalonados que utilizan *reactores secuenciales discontinuos* (SBRs), tal y como se discutirá a continuación.

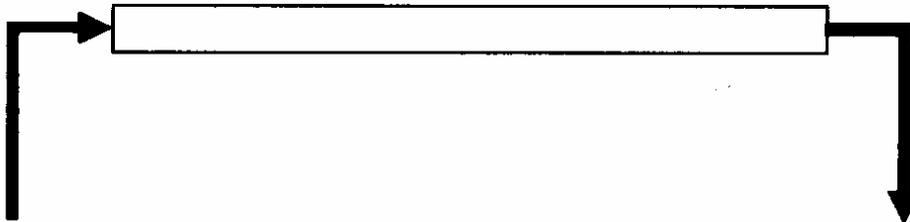
Reactores de mezcla-completa frente a flujo en pistón

Los biorreactores continuos se pueden diseñar y operar como reactores mezcla completa, reactores flujo en pistón, o como una combinación de estos dos tipos extremos.

En un *reactor mezcla-completa*, el contenido del reactor se hace completamente homogéneo mediante el uso de un aparato de mezcla, tal y como se muestra en la Figura 4.1. Cuando entra al reactor, la alimentación se encuentra completamente homogeneizada dentro del seno del líquido. El flujo que sale del reactor tiene la misma composición que el líquido contenido en el mismo. Al reactor mezcla-completa frecuentemente se le conoce como *reactor de agitación continua* [continuous stirred-tank reactor (CSTR)].



(a) Reactor de agitación continua (continuous stirred-tank reactor (CSTR))



(b) Reactor de flujo pistón (plug flow reactor)

FIGURA 4.1. Reactor de mezcla completa (CSTR) y reactor de flujo pistón.

En un *sistema flujo en pistón*, el material de alimentación se mueve a través del reactor sin interactuar (proceso ideal), ni antes ni después, con el material afluente. Por lo tanto, la composición del fluido varía en cada punto mientras se mueve a lo largo del reactor y se produce la reacción. Una representación gráfica típica de estos reactores sería la de un tubo, en el que cualquier chorro líquido que entre al principio del reactor, aparecerá al otro lado después de un tiempo igual al necesario para que el chorro recorra la longitud del reactor.

Ambos tipos de reactores se usan para caracterizar el comportamiento de algunos sistemas biorreactores utilizados en el tratamiento de aguas residuales, como el proceso de fangos activados que se describirá más detalladamente a continuación. Además, también son posibles algunas combinaciones intermedias.

Los reactores con flujo en pistón normalmente son más eficaces en la mayoría de las aplicaciones de tratamiento de aguas residuales, ya que las reacciones biológicas responsables de la descontaminación de los residuos son directamente proporcionales a la concentración de compuestos residuales. Por lo tanto, un reactor de mezcla completa, en el que la concentración media de los contaminantes necesariamente ha de ser baja (ya que también es la concentración del efluente), presenta un menor rendimiento de conversión de residuos por unidad de volumen de reactor que un reactor de flujo en pistón, en el que el material efluente no se mezcla con los residuos entrantes. Por la misma razón, los reactores de flujo en pistón son más sensibles a las eventualidades del sistema, como por ejemplo una carga excesiva, ya que ésta no se diluye en la totalidad del volumen del reactor, como sucede en un sistema de mezcla completa. De cualquier forma, un sistema de flujo en pistón ideal es difícil de conseguir en la práctica, puesto que es inevitable algún grado de mezcla debido a la propia dispersión longitudinal. Por lo tanto, lo que se encuentra con frecuencia son sistemas combinados formados por elementos de ambos tipos de reactores.

Recirculación del fluido

En muchas ocasiones es ventajoso proporcionar al reactor una *recirculación del fluido*, es decir, un flujo lateral procedente del efluente del reactor que se recircula parcialmente al reactor (Fig. 4.2). Incluso si el reactor es del tipo de flujo pistón, es evidente que tal flujo recirculado introducirá algún grado de mezcla en el sistema²⁹. Esto sucederá especialmente si la relación entre el caudal de recirculación y la del flujo de alimentación es alta. Los flujos recirculados, por lo tanto, se pueden utilizar para incrementar el nivel de flexibilidad de un sistema. Además, los flujos recirculados incrementan el tiempo de residencia del material tratado en el reactor.

Aún más importante es el uso de flujos recirculados en los que sólo se recircula un componente específico y separable del contenido de reactor. Esto se realiza en muchos sistemas de tratamiento aerobio y anaerobio. En estos sistemas, la biomasa constituye el «biocatalizador» responsable de las reacciones degradadoras. Por ello, con frecuencia es conveniente maximizar la concentración de biomasa en el biorreactor con el fin de mejorar el rendimiento degradador del mismo. Esto se

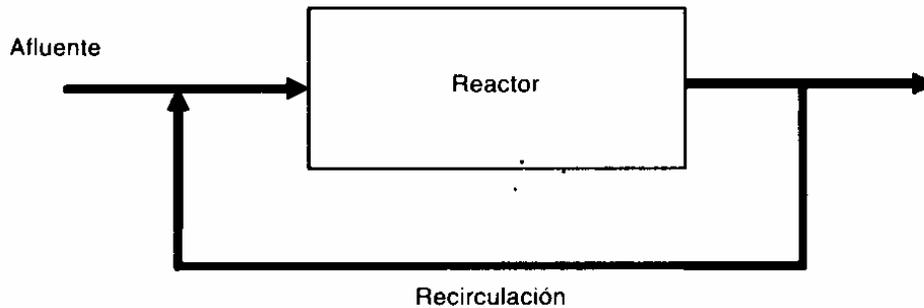


FIGURA 4.2. Reactor con recirculación.

puede lograr utilizando un decantador después del reactor. En el decantador, la biomasa se separa parcialmente del líquido y después se recircula al reactor. En estos sistemas, el decantador a menudo se convierte en el componente clave de todo el sistema, y la mayoría de los fallos son atribuibles a su incapacidad para separar la biomasa durante los tiempos de residencia en el decantador.

Sistemas de biomasa inmovilizada frente a biomasa en suspensión

Otra forma de maximizar la retención de biomasa dentro del reactor es evitar su salida junto con el flujo efluente. Esto se puede lograr inmovilizando la biomasa sobre un soporte que no pueda salir con el efluente. Por este motivo, existen varias configuraciones de reactores que se presentan con un material de relleno al que se adherirán los microorganismos formando una película biológica. Este proceso de adherencia con frecuencia se ve incrementado por la preferencia de la población microbiana a crecer acoplada a un soporte, en vez de hacerlo en suspensión. En otros casos, los sólidos a los que se acoplan los microorganismos son pequeñas partículas (como arena) que pueden mantenerse fácilmente en suspensión (es decir, *de lecho fluidizado*) mediante el flujo residual que entra en el reactor, pero que no son lo suficientemente ligeras como para ser arrastradas por el flujo efluente. Finalmente, los organismos también pueden ser inmovilizados en un soporte sobre el que se hace gotear el efluente residual (como en el caso de los reactores de lechos bacterianos), o en un soporte que se sumerge periódicamente en la disolución de residuos [como en el caso de los discos rotatorios o biodiscos (RBC)].

En todos estos sistemas, mientras la biomasa se va espesando sobre la superficie a la que está adherida, será cada vez más difícil que los nutrientes lleguen en cantidad suficiente a los organismos más interiores. Al final, esto conducirá a una pérdida de la capa de biomasa contenida sobre una partícula dada o un área de superficie (desprendimiento masivo). Este fenómeno ayuda a mantener un nivel constante de biomasa en el reactor, que de otra forma, se atascaría.

Configuraciones básicas de los biorreactores

Actualmente, en el sector industrial, se utiliza un gran número de biorreactores distintos. Se diferencian no sólo en su configuración física, sino también en los diferentes requisitos que se imponen al proceso y a la actividad metabólica microbiana. Por ejemplo, los reactores aerobios, invariablemente, tendrán algún mecanismo para el suministro y distribución del aire, rasgo ausente en los reactores anaerobios, y como el aire se puede suministrar de distintas formas, se puede esperar la existencia de un número equivalente de tipos de reactor. Además, los mecanismos para la inmovilización microbiana, la operación continua o discontinua, y la mezcla, entre otras cuestiones, dan lugar a las características esenciales que configuran un tipo de reactor específico.

En general, los biorreactores para el tratamiento de aguas residuales se sitúan dentro de dos amplias categorías:

- *Biorreactores con biomasa en suspensión.* En estos reactores, la biomasa responsable de la acción degradadora se encuentra en suspensión y, por lo tanto, se deberá recuperar y recircular parcialmente al reactor para que el proceso sea autosostenible. El proceso de fangos activos y todas sus variantes se basan en el uso de estos tipos de reactores. Algunos procesos continuos anaerobios también utilizan este método. Los reactores agitados mecánicamente y los reactores con aireadores de superficie (rotores) son algunos ejemplos de esta categoría.
- *Biorreactores con biomasa inmovilizada.* En estos reactores, la biomasa se inmoviliza sobre algún tipo de soporte y no se pierde con el efluente (excepto en las cantidades deseadas). Este tipo de reactores se utiliza en algunas aplicaciones de tratamiento aerobio, como por ejemplo, los reactores con relleno, los de lecho bacteriano, los de biodiscos y los de lecho fluidizado. Además, éste es el método utilizado en el diseño de la mayoría de los procesos continuos de tratamiento anaerobio.

En el resto de esta sección se ofrece una breve visión general de la configuración de la mayor parte de los reactores utilizados en el tratamiento biológico de aguas residuales, y de sus características.

Biorreactores con agitación mecánica

Los biorreactores agitados son recipientes metálicos o de hormigón que cuentan con un sistema mecánico de agitación normalmente formado por varios motores que mueven uno o más agitadores. Si los reactores son pequeños y cerrados generalmente serán cilíndricos y metálicos, además tendrán un eje central equipado con rodetes (aspas) y movido por un motor. Con deflectores verticales montados cerca de la pared del recipiente se elimina la rotación sin mezcla (remolino) del líquido. Las grandes instalaciones abiertas, que se encuentran con frecuencia en las plantas de tratamiento aerobio, normalmente son depósitos rectangulares con

varios puntos de agitación distribuidos por igual en la superficie del depósito. En la Figura 4.3 se muestra un ejemplo de un biorreactor aireado y agitado.

La agitación en estos sistemas cumple dos finalidades. Por un lado, conseguir una mezcla homogénea, y para ello se dispersan por todo el reactor los nutrientes disueltos y la biomasa. Para cada rodete, el consumo de energía P puede calcularse mediante la ecuación:

$$P = N_p \rho N^3 D^5$$

donde N es la velocidad de agitación (en revoluciones por unidad de tiempo), D es el diámetro del rodete, y N_p es una constante (también llamada *constante de Newton*), es decir, una constante adimensional que está en función del tipo de rodete. Por ejemplo, para las turbinas de discos con seis aspas N_p es igual a 5. Los valores

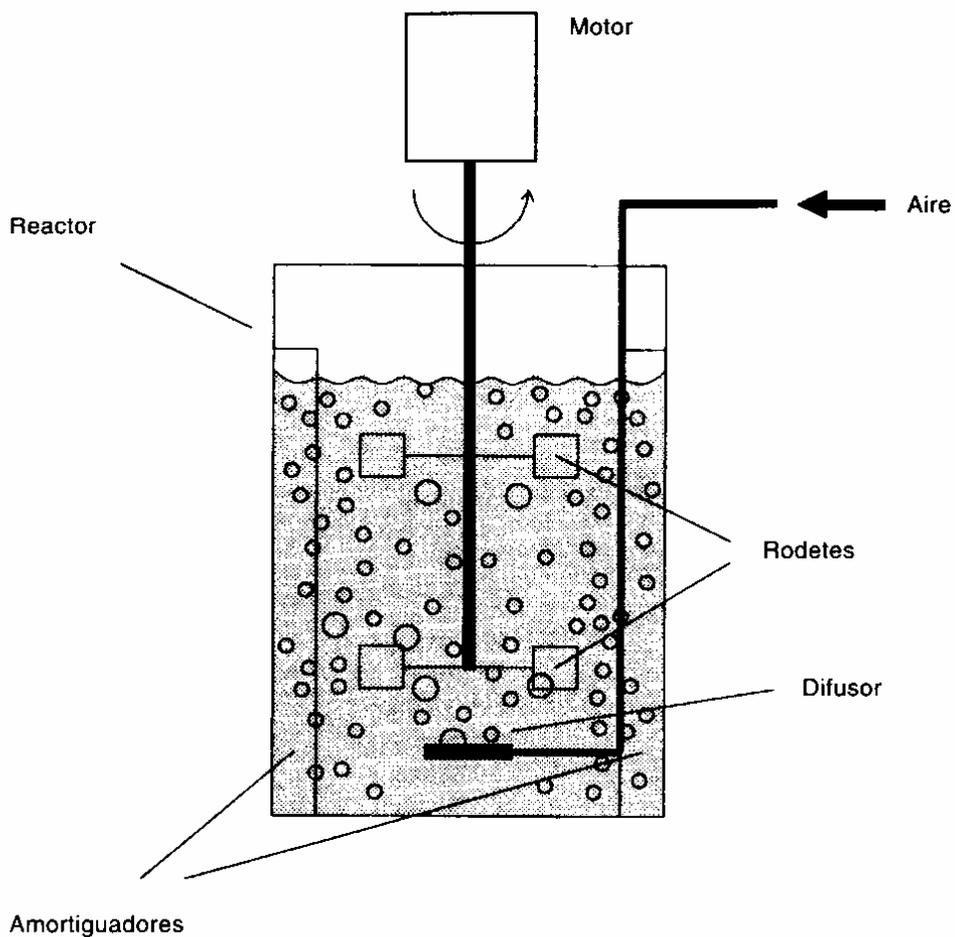


FIGURA 4.3. Reactor agitado y aireado.

de N_p , asociados a otros tipos de agitadores se pueden encontrar en la literatura relativa al tema^{7,35,38}.

Si el reactor es aerobio, el segundo objetivo del sistema de agitación es la dispersión del aire rompiendo las burbujas de aire, de esta forma, se incrementa el área de interfase gas-líquido y aumenta la transferencia de oxígeno. Las turbinas de discos son agitadores muy eficaces para la dispersión pero consumen una importante cantidad de energía. Existen varios tipos de agitadores que pueden proporcionar unos resultados parecidos (en términos de dispersión del aire y capacidad de bombeo) con un menor consumo energético³⁵. Se utiliza una tubería de aire acoplada a un compresor para bombear el aire a los difusores dentro del reactor. Normalmente, el aire se difunde justo por debajo del rodete inferior, de esta forma, tiene que atravesarlo y dispersarse en burbujas finas. El consumo energético del agitador bajo condiciones de aireación, P_g , es solamente una pequeña parte del consumo equivalente bajo condiciones de no aireación. La relación entre P y P_g viene dada por

$$\frac{P_g}{P} = f(N, Q_g)$$

donde la función $f(N, Q_g)$ depende de la velocidad de agitación y de la tasa de aireación (Q_g). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el valor de $\rho(N, Q_g)$ es una constante que se encuentra dentro del rango 0,4-0,6³⁵. La velocidad de transferencia del oxígeno por unidad de volumen del líquido, N_{O_2} , viene dada por la expresión:

$$N_{O_2} = k_a(C_s - C)$$

donde C_s y C son las concentraciones de oxígeno en saturación y en agua, respectivamente, y el valor de k_a (igual al coeficiente de transferencia de masas k_l por el área interfase/unidad de volumen del líquido a) viene dado por³¹:

$$k_a = \beta (P_g/V)^{0.7} v^{0.6}$$

En esta ecuación, v es la velocidad superficial del gas, y el valor numérico de la constante β está entre 1,2 y 2,3 si todas las variables se encuentran en unidades del SI. Los niveles típicos de transferencia del oxígeno se sitúan en el rango 1-1,8 kg de O_2 transferido por kWh de energía consumida¹⁴.

Estas expresiones ponen de manifiesto que la velocidad de transferencia del oxígeno no aumenta de forma lineal en relación al consumo energético y la velocidad de agitación. Esto puede ser importante a la hora de optimizar un sistema aerobio, para el cual, el consumo energético puede llegar a constituir una parte fundamental de los costes operativos.

Biorreactores con aireador de superficie (rotores y turbinas)

Los aireadores de superficie normalmente se encuentran en grandes reactores. Se trata de un agitador que gira muy cerca de la superficie del líquido y atrapa el aire en la interfase gas-líquido, tal y como se muestra en la Figura 4.4. La mezcla aire-líquido se dispersa a través del depósito mediante la acción giratoria del rodete. Si se airean grandes depósitos generalmente se utilizan varios de estos dispositivos. La principal ventaja de este método de dispersión del aire es que no se usa ningún compresor de aire externo. El motor/impulsor se puede montar sobre una viga fija dispuesta sobre el depósito, o puede colocarse con flotadores sobre la mezcla de residuos. Este último sistema es especialmente conveniente si se quiere asegurar que el rodete siempre se encuentre a la misma profundidad, independientemente de las variaciones de nivel.

Existen diferentes configuraciones de agitadores. Normalmente están formados por unas turbinas, abiertas o cerradas, de diferentes formas y tipos de aspas⁴⁵. El consumo energético de estos agitadores generalmente es menor que el consumo de los agitadores sumergidos. Son comunes números de potencia del orden de 1 a 2⁵³. Las transferencias típicas de oxígeno están entre 1,5 y 2,5 kg O₂/kWh. Para asegurar que el agitador realice una suspensión completa de la biomasa, la profundidad de los tanques de aireación normalmente será menor de 4 m¹⁴.

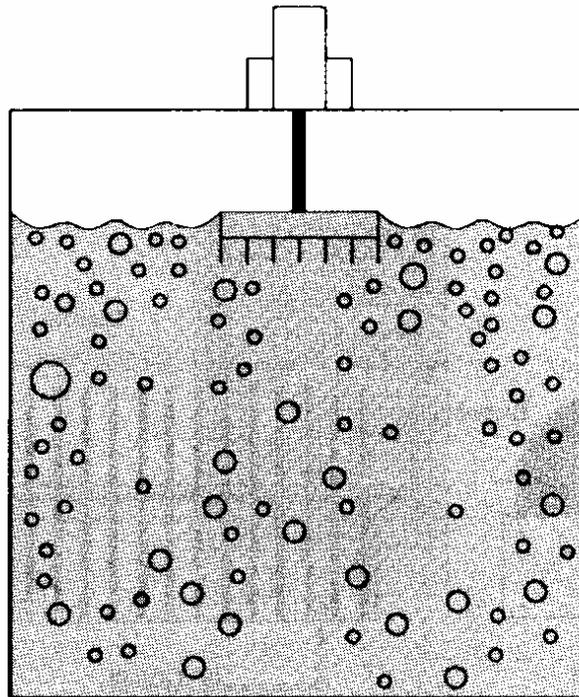


FIGURA 4.4. Reactor con aireador de superficie (biodiscos).

Mediante los rotores de cepillo también se obtienen unas tasas de transferencia de oxígeno comparables a las conseguidas mediante los aireadores de superficie. En los rotores de cepillo se emplean unas paletas cilíndricas de giro horizontal a alta velocidad que, parcialmente sumergidas en el líquido, sirven para dispersar el aire y homogeneizar el líquido. Este tipo de equipo de aireación se utiliza en los estanques de oxidación.

Biorreactores RBC (contactores biológicos rotatorios o biodiscos)

Estos reactores son usados exclusivamente en los procesos de tratamiento aerobio. Están formados por un número variable de discos montados sobre un eje horizontal parcialmente sumergido en el líquido que gira lentamente, tal y como se muestra en la Figura 4.5. La biomasa se acopla a ambas superficies de los discos. La acción giratoria la expone, de forma alterna, al líquido (que proporciona los nutrientes disueltos) y al aire (que proporciona el oxígeno). En la sección titulada «Sistemas de reactor aerobio» se ofrecen más detalles sobre la operación y propiedades de este tipo de reactor.

Biorreactores de lechos fijos

Los reactores de lecho fijo representan uno de los dispositivos de separación y uno de los tipos de reactores más comunes en la industria química. En el tratamiento de aguas residuales, se utilizan los microorganismos inmobilizados en su interior para degradar los contaminantes de las aguas residuales.

Los lechos fijos están formados por un recipiente (que puede estar abierto o cerrado) que contiene internamente un material de relleno. El relleno se diseña para que posea una gran área superficial donde la fase líquida, la fase gas (si existe) y los organismos inmobilizados puedan contactar entre sí. Normalmente, para

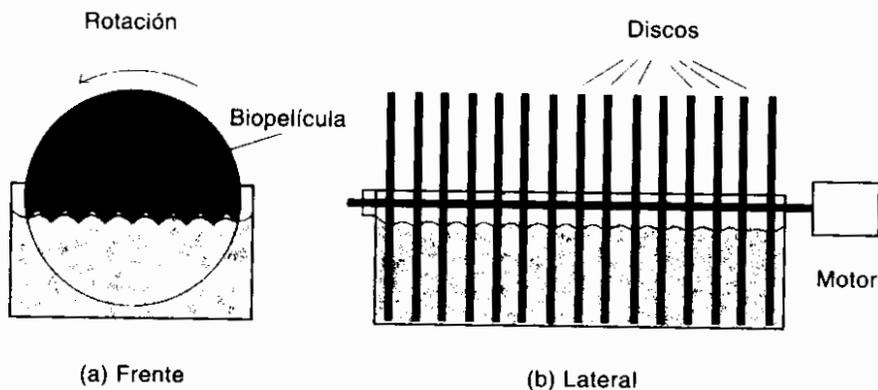


FIGURA 4.5. Contactor biológico rotatorio.

el tratamiento biológico de las aguas residuales, el relleno se elabora con materiales sueltos, como gravilla, piedra de lava o material plástico.

Los lechos fijos se pueden emplear para los procesos anaerobios y aerobios. Los lechos anaerobios son recipientes cerrados en los que sólo circula el líquido tratado en un sentido ascendente dentro del lecho (Fig. 4.6). Se puede utilizar la misma configuración para el tratamiento aerobio, incluso cuando se usan organismos filamentosos^{4,30}. Sin embargo, esta aproximación requiere que el propio flujo se oxigene por separado para que los microorganismos puedan recibir un suministro suficiente de oxígeno. Este proceso puede ser especialmente beneficioso si el compuesto tratado es volátil y puede ser arrastrado por el burbujeo de aire que se realiza directamente sobre la columna. Recientemente, se ha utilizado este método para tratar un flujo contaminado con cloruro de metileno, el flujo se ha hecho pasar a través de una columna que contenía un lecho inmobilizado de un solo organismo aerobio⁴⁰.

En la mayor parte de los casos, sin embargo, los lechos fijos aerobios requieren la presencia adicional de una fase de gas. En este caso, la fase líquida se añade desde la parte superior del reactor, desde allí, se hace circular hacia abajo mediante la acción de la gravedad, y el aire se introduce desde el fondo. Si el reactor está abierto, el aire se mueve a través del lecho por convección (tiro natural). La aplicación más utilizada de esta tecnología para el tratamiento de aguas residuales son los lechos bacterianos o filtros percoladores, que se describirán más detalladamente a continuación.

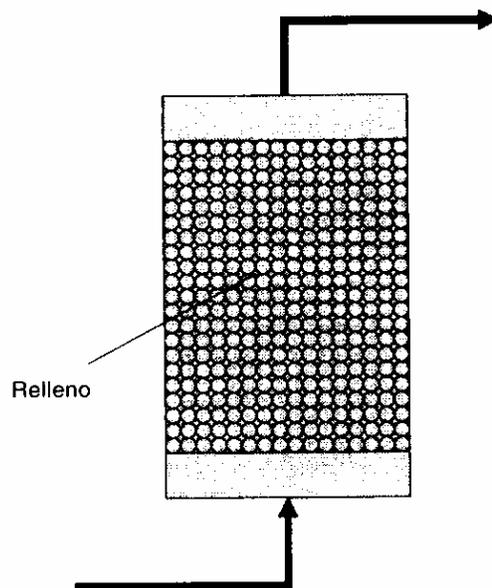


FIGURA 4.6. Reactor de lecho fijo de flujo ascendente.

Biorreactores de lecho fluidizado

Otra forma de retener a los microorganismos dentro del reactor consiste en inmovilizarlos sobre las partículas de un material más pesado que el líquido y, después, mantenerlos en suspensión utilizando el propio líquido. Éste es el método empleado por los *reactores de lecho fluidizado* (Fig. 4.7). Como partículas de inmovilización se pueden utilizar diferentes materiales, por ejemplo: arena, carbono activado, o resina. La suspensión se consigue cuando el arrastre friccional ejercido por el fluido es equivalente a la fuerza de gravedad. Experimentalmente se ha comprobado que, para partículas más pequeñas de 1 mm, la velocidad de fluido en la que se consigue la fluidización viene dada por³⁴

$$v_{ft} = v_d E_f^n 10^{-(d/D)}$$

donde v_{ft} es la velocidad de fluidización, v_d es la velocidad terminal de las partículas en caída libre dentro del líquido, E_f es la porosidad del lecho, n es un exponente que se encuentra en función del régimen de flujo, d es el diámetro de partícula, y D el diámetro del reactor.

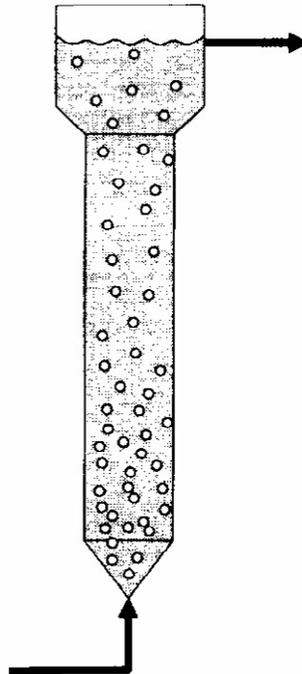


FIGURA 4.7. Reactor de lecho fluidizado.

Como existe un área superficial grande por unidad de volumen del reactor, la concentración de biomasa en los reactores de lecho fluidizado puede ser 10 veces mayor que la que se puede conseguir sin inmovilización⁹.

Depósitos con difusores y biorreactores con flujo de aire ascendente

En algunos biorreactores aerobios, la energía suministrada al gas en forma de presión se emplea también para homogeneizar el líquido, e incluso para hacerlo circular. En los tanques de aireación, dentro del proceso tradicional con fangos activados que se describe a continuación, el aire se suministra de una forma alternativa mediante el uso de *difusores* (en vez de utilizar la agitación mecánica), se trata de una serie de dispositivos colocados en la parte inferior del depósito capaces de producir burbujas⁴⁵. Existen dos métodos, el primero consiste en introducir aire a través de un material poroso. De esta forma se obtendrán burbujas finas. El segundo método consiste en forzar aire a través de una serie de orificios, con lo que se obtienen burbujas más grandes. También se pueden emplear boquillas de chorro, tal y como se describe a continuación bajo el epígrafe «Biorreactores con sistemas de aireación de chorro». Normalmente, los difusores se montan sobre una red de tuberías de aire localizadas en el fondo del depósito con el fin de proporcionar una oxigenación uniforme en el líquido. Las burbujas producidas por los difusores generan también un flujo inducido que mezcla el líquido verticalmente, y sirve para suspender la biomasa y los sólidos que se encuentran en suspensión. En estos tanques de aireación, la distribución del aire es uniforme y, en consecuencia, no se induce ninguna recirculación neta del líquido que se pueda considerar importante.

Sin embargo, si el aire se suministra solamente en algunos puntos específicos de una laguna o de un reactor se puede producir un flujo importante de recirculación. Éste es el principio que se encuentra detrás de los *reactores de aire ascendente (air lift)* (Fig. 4.8). Este concepto se utiliza fundamentalmente en los reactores cilíndricos profundos que cuentan con conductos de aireación, es decir, tubos cilíndricos concéntricos abiertos en ambos extremos y localizados justo por encima del punto de difusión del aire. Cuando las burbujas de aire suben en el tubo, inducen un flujo líquido ascendente dentro de éste y un flujo descendente en la región exterior al tubo. Esta región exterior no tiene muchas burbujas, ya que éstas se escapan y dejan el reactor cuando suben del conducto de aireación.

Este principio se utiliza en los biorreactores de pozo profundo que pueden presentar una profundidad de hasta 100-300 m, poseen un consumo energético muy bajo ($0,17 \text{ kW/m}^3$), y tienen unos excelentes niveles de transferencia de oxígeno ($6 \text{ kgO}_2/\text{kWh}$)^{21,45}.

Biorreactores de chorro

Los biorreactores de chorro utilizan chorros de líquido para recircular el contenido del reactor y dispersar cualquier gas que se encuentre presente (Fig. 4.9). El líqui-

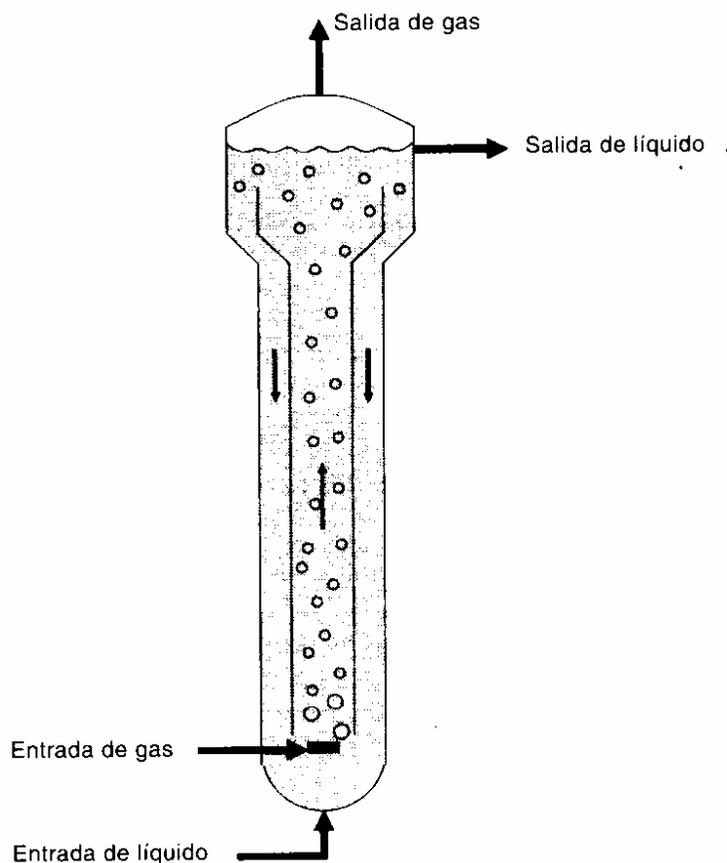


FIGURA 4.8. Reactor de flujo ascendente de aire (*airlift*).

do que alimenta el chorro normalmente se extrae del propio reactor mediante una desviación externa y una bomba. Cualquier flujo afluyente del reactor podrá servir también de alimentación al chorro. En la mayoría de los casos, el chorro se encuentra sumergido y la boquilla se orienta de forma que el material pueda recircular en el reactor. Por ejemplo, si el chorro se localiza en el fondo del reactor, el líquido que lo alimenta se extraerá desde la parte media o superior del mismo. Para establecer un fuerte flujo recirculador dentro del reactor, la boquilla del chorro se puede localizar dentro de los tubos de corriente o en una posición asimétrica dentro del reactor.

Los chorros de líquido también se pueden alimentar introduciendo gas. Existen un gran número de diseños de boquillas de dos fases para este propósito. Por ejemplo, en las boquillas de chorro libre, el chorro de líquido y el gas entran a través de líneas separadas, situándose la salida del gas al final de la boquilla de chorro líquido para maximizar la dispersión del gas^{41,47}. En otro diseño, una boquilla venturi para líquidos absorbe el gas que posteriormente será dispersado²⁴.