



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

18
Zij

AI SLAM IEN TO Y SELECC ION DE MICROFLORA
BIODEGRADADORA DE FENOL A PARTIR DE
SUELO DE ZONAS INDUSTRIALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
P R E S E N T A :
MAURO CALIXTO CANO



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Guadalupe Velez Pratt
Vocal: Prof. Lilia Vierna García
Secretario: Prof. Beatriz Luna Millán
1^{er} Suplente: Prof. María Elsa Escudero García
2^{do} Suplente: Prof. Marco Antonio Ortiz Jiménez

Sitio donde se desarrolló el tema

Sección Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología


Asesor del tema

Q. Lilia Vierna García



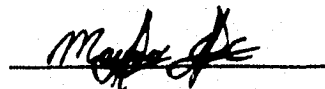
Asesor técnico

Q.F.B. Ezequiel Gutiérrez Gómez



Sustentante

Mauro Calixto Cano



AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES :

**Por el amor,
apoyo y confianza que me han
otorgado sin medida.**

A MIS HERMANOS :

**Con cariño y gratitud
por su ayuda y confianza
para seguir adelante.**

**Por su colaboración asesoría y apoyo
en la elaboración de éste trabajo
Q. Lilia Viema García**

**Por su valiosa ayuda en la
realización de éste trabajo
Q.F.B. Ezequiel Gutierrez Gómez.**

DEDICATORIAS

Con gratitud y cariño
a todos los maestros
que forjaron en mí persona
el espíritu de superación constante.

A mis sinodales Q.F.B. Guadalupe Velez
y Q.F.B Beatriz Luna por su tiempo
y dedicación para la revisión del
presente trabajo.

A todos mis amigos y compañeros
por todos los grandes momentos.

A todas aquellas personas que de
una u otra forma colaboraron
en la realización del presente trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México
y a la FACULTAD DE QUÍMICA.

¡ Mil Gracias !

INDICE

	pág.
INTRODUCCION	i
OBJETIVOS	ii
1- GENERALIDADES.	1
1.1 Fenol.	2
1.2 Propiedades fisicoquímicas.	2
1.3 Fuente industrial.	3
1.4 Usos del compuesto y sus derivados.	5
1.5 Consumo por las industrias.	11
2- DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS POR MICROORGANISMOS.	13
2.1 Generalidades	14
2.2 Estrategias bioquímicas para el catabolismo de compuestos aromáticos.	17
2.3 Rutas centrales e intermediarios clave.	24
2.4 Organización y regulación de genes para el catabolismo de hidrocarburos aromáticos.	32
2.5 Microorganismos involucrados en la degradación de fenol y compuestos derivados.	36
2.6 Mecanismo de degradación de fenol.	38
3. DESAROLLO EXPERIMENTAL .	40
3.1 Material.	41
3.2 Equipo.	41
3.3 Medios de cultivo.	42
3.4 Reactivos y soluciones.	42
3.5 Aislamiento de microflora.	44
3.6 Caracterización de géneros.	46
3.7 Cuantificación de fenol residual.	49

4. RESULTADOS Y DISCUSION.	53
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	64

Capítulo

1

- 1.1 Fenol
- 1.2 Propiedades fisicoquímicas
- 1.3 Fuente industrial
- 1.4 Usos del compuesto y sus derivados
- 1.5 Consumo por las industrias

**Fenol como materia prima y
compuestos derivados**

1. GENERALIDADES

1.1 FENOL

Ácido carbólico, ácido fénico, ácido fenílico, benzofenol, hidróxido de fenilo, hidroxibenceno, oxibenceno; son los nombres con los cuales se le conoce a este compuesto tan versátil. Es una clase de compuesto orgánico aromático en el cual uno o más grupos hidroxilo atacan directamente al anillo del benceno. (Molina, H. 1965). Runge lo descubrió en el alquitrán de hulla; se halla en pequeña cantidad combinado en la orina.

Se separa de los aceites de alquitrán tratándolos con soluciones de sosa cáustica, se purifica por repetidas destilaciones, repitiendo la operación y aún a veces destilando en el vacío en recipientes especiales, se obtiene químicamente puro. Fig. 1.1.

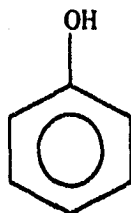


Fig. 1.1 Fenol

1.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

El fenol puro cristaliza en largas agujas incoloras que funden a 42.5 °C ; hierve sin alteración a 180 °C. Basta una cantidad mínima de agua para que se mantenga líquido, aun a temperatura ambiente. Su peso específico es 1.084 a 0 °C y 1.070 a 25 °C; tiene cierta solubilidad en agua (9 g por 100 g de agua), probablemente por la formación de puentes de hidrógeno con ella. Es incoloro, sin embargo; al igual que las aminas aromáticas, se oxida con facilidad, por lo que puede tomar una tonalidad rojiza, a menos de que esté cuidadosamente purificado, por la presencia de productos de oxidación; su pK a 25 °C es de 10.0, el pH de soluciones acuosas es como de 6.0; presenta un olor característico (ácido fénico, timol); soluble en agua, muy soluble en alcohol, cloroformo, éter, glicerol, petróleo, disulfuro de carbono, combustible; su temperatura de autoignición es de 1319 °F. (Morrison y Boyd. 1967).

La DL₅₀ en ratas es de 530 mg/Kg; en humanos los efectos tóxicos por ingestión de pequeñas cantidades de fenol pueden provocar náusea, vómito, colapso circulatorio, taquipnea, parálisis, convulsiones, coma, ictericia, necrosis de boca y tracto gastrointestinal, muerte por paro respiratorio.

Pueden ocurrir envenenamientos fatales por absorción del compuesto sobre grandes áreas de la piel. (Goodman y Gilman. 1991).

El fenol es un compuesto bastante ácido, distinguiéndose marcadamente en esto de los alcoholes, menos ácidos incluso que el agua; es decir, reacciona con el hidróxido de sodio formando agua y fenóxido de sodio, en cambio los alcoholes que son ácidos más débiles que el agua, no sufren la reacción anterior.

El grupo OH unido al anillo aromático lo activa respecto a la sustitución electrofílica y, al mismo tiempo, ejerce un efecto director hacia las posiciones orto y para. Los agentes oxidantes son reactivos electrofílicos; como el anillo aromático del fenol es nucleofílico, puede reaccionar con el agente oxidante proporcionándole los electrones que éste requiere. La oxidación pasa por varias etapas que culminan con la destrucción del anillo aromático. (Wingrove, S.A. 1989).

1.3 FUENTE INDUSTRIAL

La creciente demanda por el fenol y el desarrollo de nuevos procesos para su elaboración lo colocan dentro de los principales compuestos de fabricación a nivel industrial.

Por la cantidad que se produce ocupa uno de los lugares más altos en la lista de compuestos aromáticos sintéticos. Del alquitrán de la hulla se obtiene cierta cantidad de fenol; la cantidad más importante, sin embargo, es sintética.

En la actualidad existen diversos métodos industriales para la preparación del mismo.

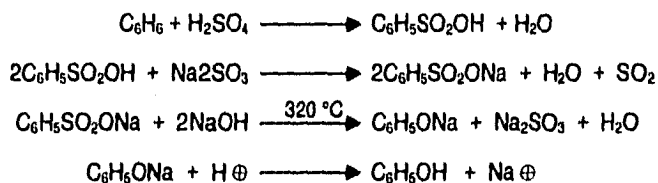
De los 7 procesos conocidos para la obtención de fenol, seis emplean benceno como materia prima básica y solo uno emplea el tolueno. (Rakoff, H. 1974).

Se tienen entonces 7 procesos de elaboración de fenol :

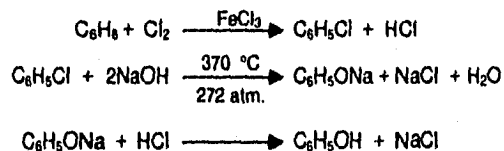
- 1.- Proceso de sulfonación.
- 2.- Proceso de cloración (Dow).
- 3.- Proceso Raschig.
- 4.- Proceso a partir del cumeno.
- 5.- Proceso de cloración (clorobenceno-carbonato).
- 6.- Proceso de oxidación de benceno.
- 7.- Proceso a partir de tolueno.

De los procesos anteriormente citados, cuatro son los más utilizados.

Sulfonación. El método más antiguo que todavía se encuentra en uso, consiste en la fusión de la sal sódica del ácido bencensulfónico con hidróxido de sodio. A continuación se presentan las reacciones que se llevan a cabo en este proceso :

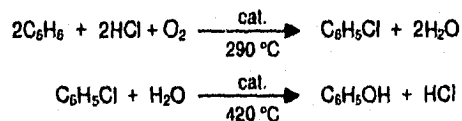


Cloración (Dow). En este proceso, el clorobenceno se obtiene por halogenación directa del benceno con cloro. Posteriormente el clorobenceno se hidroliza con una solución acuosa de hidróxido de sodio, a 270 °C y 270 atm.

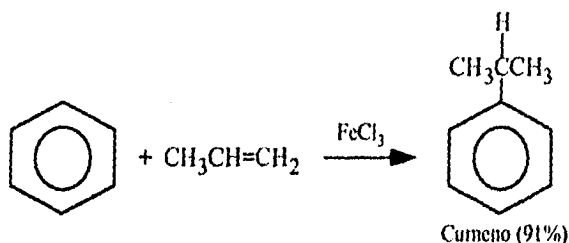


El NaCl se electroliza para obtener cloro e hidróxido de sodio, que son materias primas en el proceso. El hidrógeno que se obtiene en la electrólisis se hace reaccionar con el cloro para formar el HCl necesario.

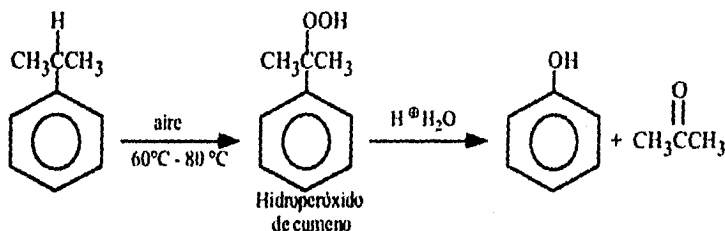
Raschig. El benceno se clora con HCl y aire, en presencia de un catalizador apropiado, y el clorobenceno resultante se hidroliza con agua, en presencia de otro catalizador.



Cumeno. El proceso más reciente y que posiblemente llegue a ser en un futuro próximo el más importante; el cumeno es el isopropilbenceno y puede obtenerse mediante una reacción de tipo Friedel y Crafts entre benceno y propileno, en presencia de un ácido de Lewis.



Al ser tratado con aire, el cumeno se transforma en un hidroperóxido, que se descompone en medio ácido produciendo fenol y acetona.



Esta reacción da como productos fenol y acetona, que son dos compuestos químicos de gran valor comercial.

1.4 USOS DEL COMPUESTO Y SUS DERIVADOS

1.- Resinas fenólicas

Las resinas fenólicas, por su durabilidad, lisura, resistencia a los agentes ambientales y propiedades dieléctricas han sido muy usados en el campo de polvos moldeables, laminados, adhesivos y resinas de recubrimientos

Bakelita. - Es el producto de condensación que se obtiene calentando el ácido fénico con aldehído fórmico; tiene el aspecto y el comportamiento de ciertas resinas y de ciertas sustancias plásticas. Los usos de la bakelita son variadísimos : las soluciones acuosas de la bakelita sirven como barnices para objetos de madera y de metal; a demás es casi tan elástica como el marfil y sirve por lo tanto para fabricar bolos de billar, boquillas para cigarros, puños de parasol, peines, cepillos, botones, discos para fonógrafos, etc, etc.

Polvos moldeables.- Estos polvos se moldean para dar una gran variedad de productos tales como cajas y bocinas de teléfono e implementos eléctricos.

Laminados fenólicos.- Se emplean generalmente para partes estructurales, tales como hojas, tubos, canales, varillas, etc.

Adhesivos fenólicos.- Estas resinas pueden usarse como polvos, líquidos y en algunos casos como hojas delgadas. Se emplean como impermeabilizantes y muy ampliamente en la manufactura de empaques, aislantes y materiales abrasivos.

Recubrimientos de protección.- En vista de su excelente resistencia al calor y muchos productos químicos, son de aplicación en el recubrimiento de tanques y similares. La reacción de ciertos fenoles modificados con formaldehído producen resinas que cuando se emplean como barnices, proporcionan un recubrimiento de secado rápido, liso y de gran resistencia química.

Resinas epoxi.- Estas resinas termofijas, presentan una variadísima combinación de propiedades; su adhesión, su resistencia a productos químicos y agentes ambientales, así como su flexibilidad. De excelentes propiedades dieléctricas, se emplean en instrumentos eléctricos y electrónicos. En recubrimientos de exteriores está su más importante aplicación.

Policarbonatos.- Estos termoplásticos se producen a partir de bisfenol y fosgeno, la peculiaridad más notable de estas resinas y que explica su popularidad, es la resistencia al impacto y a la temperatura.

2.- Petroquímica.

El fenol y sus derivados son extensamente usados en la refinación de productos petroquímicos. Solo o mezclado con otros solventes, el fenol es usado en extracciones y contracorriente para eliminar materias indeseables de los aceites combustibles.

Es además materia prima para la elaboración de muchos estabilizadores y antioxidantes en aceites de motores, creyéndose que estos materiales dirigen la oxidación de manera tal que reducen al mínimo la formación de lodos e inhiben la corrosión.

3.- Materia prima para productos químicos.

Se obtienen productos muy especializados por la alquilación del fenol, tales como el p-terbutil-fenol, p-sec-butil-fenol, nonilfenol y el amilfenol. Estos productos se usan extensamente en la producción de resinas fenólicas

modificadas y en la obtención de agentes tensoactivos no-iónicos al reaccionarlos con etileno u óxido de propileno

El *o*-sec-butil-fenol, al nitrarlo a dinitro-*o*-sec-butil-fenol da un herbicida y fungicida muy empleado y efectivo.

La cloración del fenol, produce los *o*- y *p*-clorofenoles; el 2,4 diclorofenol, 2,4,5 triclorofenol y el pentaclorofenol. El 2,4 dicloro y el 2,4,5 tricloro fenoles con el ácido cloromonoacético dan los ácidos 2,4 D y 2,4,5 T, que son herbicidas de acción selectiva. El pentaclorofenol encuentra aplicación como preservativo de madera. El catecol, puede obtenerse del *o*-clorofenol y el *p*-clorofenol se usa como intermediario para la fabricación de colorantes y productos veterinarios. (Molina, H. 1963).

4.- Desinfectantes y Conservadores.

El fenol que fue usado por primera vez por Lister en 1860, en su trabajo para desarrollar técnicas quirúrgicas asépticas, ha sido durante mucho tiempo el patrón con el que se han comparado los otros desinfectantes al valorar su actividad bactericida. Muchos otros desinfectantes de los que hoy se dispone, son mucho más efectivos y son activos a concentraciones considerablemente más bajas. (Fuerst, R. 1974).

La Fig. 1.2 muestra la estructura química del fenol y unos cuantos de los numerosos derivados del fenol que han sido preparados para su uso como desinfectantes. Estos compuestos actúan primordialmente desnaturalizando las proteínas de la célula y dañando las membranas celulares. Los cresoles son varias veces más germicidas que el fenol; el *o*-fenil-fenol y otros compuestos fenólicos con muchos sustituyentes son efectivos a grandes diluciones. Los compuestos fenólicos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de la concentración empleada. Las esporas bacterianas y los virus son más resistentes a ellos que las células bacterianas vegetativas. Algunos compuestos fenólicos son altamente fungicidas. La actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos es reducida por un pH alcalino o por la materia orgánica. Las bajas temperaturas y la presencia de jabón también reducirán su actividad antimicrobiana. Los compuestos fenólicos figuran dentro de los principales desinfectantes de superficies para objetos inertes. (Pelczar, M.J. et al. 1993).

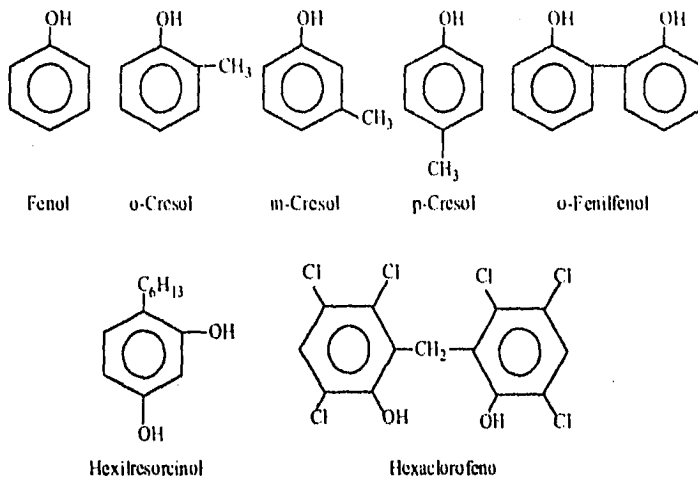


Fig. 1.2 Fenol y compuestos derivados utilizados como desinfectantes.

El fenol es un bactericida en solución al 1 ó 2 por ciento; sin embargo, es muy corrosivo para los tejidos animales. Actualmente hay en el mercado diversos derivados del fenol. Son principalmente de acción coagulante. El fenol puro se ocupa sobre todo como estándar para valorar a los desinfectantes.

Derivados de fenol. Hay docenas de estos compuestos, la mayor parte actúan en forma similar a la del fenol, o sea probablemente por acción combinada de coagulación tóxica y disolvente.

Los mecanismos de acción no están completamente aclarados, difieren según los compuestos, y probablemente también según las diferentes especies de microorganismos. Muchos de estos compuestos disminuyen la tensión superficial y tienden a quedar adsorbidos como finas películas en las superficies en las cuales se han aplicado. Por lo tanto, su acción resulta prolongada en comparación con la que tienen los alcoholes o los halógenos, que tienden a volatilizarse rápidamente. Pueden señalarse dos clases generales de derivados de fenoles: los cresoles, que son parecidos al fenol con grupos metilo ($-\text{CH}_3$) unidos y los difenoles, que están formados de dos grupos fenoles o derivados del fenol unidos directamente o mediante algún otro radical.

Cresoles. Son más eficaces que el fenol para la mayor parte de empleos generales. La solución jabonosa de cresol (utilizada en solución al 1 ó 5 por ciento), es un buen ejemplo de un buen desinfectante de cresol. La solución jabonosa de cresol tiene una tensión superficial mucho más baja que la de la solución acuosa. Este desinfectante se usa para heces, instrumentos contaminados, y para fines de limpieza y desinfección en general. Los cresoles, como el fenol son corrosivos para los tejidos vivos si se utilizan en contacto prolongado con ellos.

Los cresoles existen en forma -orto-, -meta y -para o puede obtenerse del comercio la mezcla de los tres.

Hexilresorcinol. El hexilresorcinol (4-hexil-1,3-dihidroxibenceno), otro derivado del fenol, puede utilizarse como antiséptico urinario y contra infecciones de gusanos en animales. Los preparados de hexilresorcinol mezclados con glicerina son buenos antisépticos generales, en parte porque disminuyen mucho la tensión superficial.

Difenoles. Como los cresoles, conservan mucho de su acción desinfectante en presencia de jabón y de otros reductores de la tensión superficial, y suelen utilizarse mezclados en preparados que contienen elementos tensoactivos. Entre estos compuestos desinfectantes difenólicos están lysol y varios cresoles con hexaclorofeno. Una importante ventaja de lysol sobre otros cresoles de uso común es que no forma espuma cuando se emplea en solución al 2 por ciento para cepillar y lavar superficies.

El hexaclorofeno se ha utilizado en gran número de antisépticos comerciales y otros se utilizan a veces como champús; en algunos hospitales el hexaclorofeno substituyó el alcohol para empleo tópico. Para enfermeras o dentistas que se lavan continuamente las manos, o para cuidado del cuerpo de pacientes, los compuestos que contienen hexaclorofeno son menos molestos de utilizar que muchos otros que son antisépticos irritantes, aunque quizá más eficaces.

Clorolimol. El clorolimol es otro derivado del fenol con propiedades desinfectantes similares a las anteriormente mencionadas.

Algunos desinfectantes, especialmente las soluciones acuosas de sustancias químicamente relacionadas con el fenol, muchas veces vienen valoradas según su actividad bactericida en comparación con la del propio fenol; según este sistema se dice que tienen un determinado coeficiente fénolico. (Brock, D. T. y Madigan T. N. 1991).

Coefficiente fenólico. Algunos desinfectantes, especialmente las soluciones acuosas de sustancias químicamente relacionadas con el fenol, muchas veces vienen valoradas según su actividad bactericida en comparación con la del propio fenol. Según ese sistema, dícese que tienen determinado coeficiente fenólico. Para determinar el coeficiente fenólico hay que estandarizar las condiciones de tiempo, temperatura y concentración según las especificaciones de la United States Food and Drug Administration (FDA). La técnica estándar se basa en determinar el ritmo con el cual una dilución determinada (uno en 90) de fenol puro (ácido carbólico) mata las células de una cepa determinada de *Salmonella typhi* a 20 °C en 10 minutos. Si en las condiciones estándar un desinfectante determinado mata *S. typhi* en dilución de 1:180 en comparación con la dilución de fenol de 1:90, tiene un coeficiente de fenol de 2

$$\text{Coeficiente de fenol} = \text{dilución del desinfectante} / \text{dilución de fenol}$$

Si el coeficiente fenólico es mayor de 1, el desinfectante utilizado es mejor que el fenol en las condiciones de la prueba; si tiene un valor menor de 1, el desinfectante no es tan bueno como el fenol. (Frobisher, C.A. y Fuerst, R. 1974).

1.4 CONSUMO POR LAS INDUSTRIAS.

En la **Tabla 1.1** se ilustra la distribución del consumo nacional de fenol, basada en las diferentes industrias que lo emplean como materia prima para sus diferentes productos.

<i>Compañía</i>	<i>Ton. Anuales</i>	<i>Uso</i>	<i>% del Total</i>
Bakelita de México, S.A.	1200	Resinas	26.66
Reichhold Chemicals de México S.A.	900	Resinas	20.00
Casco Química de México S.A.	500	Resinas	11.11
Adhesivos Resistol S.A.	1900	Adhesivos y Resinas	42.22
TOTAL	5400		100.00

Tabla 1.1. Distribución del consumo de fenol por Industrias.

Hasta ahora la industria de resinas es la mayor consumidora de fenol, ya que alcanza más del 50% del consumo total, como se puede ver en la **Tabla 1.2**.

<i>Compañía Fabricante de Resinas</i>	<i>Uso</i>
Bakelita de México, S.A.	Resina fenólica sólida en trozos endureable al calor. Resinas fenólicas para moldeo (En sus formas de diferentes compuestos). Resinas fenólicas para moldeo (Balatas).
Reichhold Chemicals de México, S.A.	Resinas fenólicas modificadas con brea o cloroformo Resinas fenólicas para moldeo (Fundición).
Casco Química de México, S.A.	Resinas fenólicas líquidas Resinas fenólicas en polvo Resinas fenólicas para moldeo
Adhesivos Resistol, S.A.	Resinas fenólicas para laminado Resinas fenólicas para moldeo (Adhesivos).

Tabla 1.2 Utilización de fenol para fabricación de resinas.

Las industrias consumidoras se encuentran localizadas en el país, según lo muestra en la **Tabla 1.3**.

Compañía	Localización de su planta
Bakelita de México, S.A.	Monterrey, N.L.
Reichhold Chemicals de México, S.A.	Col. Ind. Vallejo, D.F.
Casco Química de México, S.A.	Xalostoc, Edo. de México
Adhesivos Resistol, S.A.	Col. Ind. Vallejo, D.F.

Tabla 1.3 Industrias consumidoras de fenol.

El 75% del consumo está localizado entre el Distrito Federal y el Estado de México (Heredia, A. 1986).

Capítulo

2

- 2.1 Generalidades
- 2.2 Estrategias bioquímicas para el catabolismo de compuestos aromáticos.
- 2.3 Rutas centrales e intermediarios clave.
- 2.4 Organización y regulación de genes para el catabolismo de hidrocarburos aromáticos.
- 2.5 Microorganismos involucrados en la degradación de fenol y compuestos derivados.
- 2.6 Mecanismo de degradación de fenol.

**Degradación de compuestos
aromaticos por microorganismos**

2. DEGRADACION DE COMPUESTOS AROMATICOS POR MICROORGANISMOS

2.1 GENERALIDADES

El catabolismo de compuestos aromáticos por parte de los microorganismos, constituye un paso esencial en el ciclo del carbono, en relación a la oxidación de productos naturales y compuestos aromáticos adicionados al medio ambiente por las actividades realizadas por el hombre. (Dagley, S. 1978).

Aunque los compuestos aromáticos raramente predominan entre los sustratos orgánicos que llegan al suelo, representan un grupo importante de sustancias que están sujetas al ataque por parte de la microflora. Los tejidos vegetales contienen compuestos sencillos, monocíclicos, que poseen anillos de benceno, así como moléculas más complejas tales como flavonoides, alcaloides, terpenos y taninos.

Con frecuencia, los hongos y actinomicetos producen melaninas, y estas son polímeros de unidades aromáticas. Varios aminoácidos en las proteínas y muchas de las sustancias químicas sintéticas que se usan para el control de plagas son hidrocarburos aromáticos modificados.

Estas sustancias representan para la comunidad microbiana, un amplio conjunto de sustratos para degradarlos. Más aún, como muchas de las sustancias aromáticas son fitotóxicas, su destrucción es esencial para prevenir la creación de condiciones desfavorables para el crecimiento vegetal. Bajo ciertas condiciones, en lugares donde el metabolismo aeróbico activo es bloqueado, pueden acumularse tales compuestos en el suelo en concentraciones que pueden perjudicar a las plantas superiores.

De este modo los compuestos aromáticos constantemente se encuentran disponibles para la microflora en forma de humus, tejidos vegetales y células microbianas en descomposición, así como sustancias químicas sintéticas que se aplican en relación con las actividades agrícolas. Por ejemplo, cuando la paja del arroz se descompone, se liberan los ácidos p-hidroxibenzóico, vainílico, p-cumárico, ferúlico y siringico; por lo que algunos suelos pueden contener los mismos compuestos, a veces en concentraciones de 2 a 8 $\mu\text{mol/g}$ de suelo. (Alexander, M. 1978).

También se encuentran en varios suelos el benceno, tolueno, xileno, etilbenceno y naftaleno, provenientes de procesos industriales los cuales son desechados a este medio. Tales moléculas por lo general existen en un estado dinámico, siendo sintetizadas y destruidas, pero la ausencia de toxicidad demuestra que los heterótrofos continúan sirviendo como agentes efectivos y potentes para la detoxicación.

Muchos miembros de la microflora del suelo metabolizan hidrocarburos aromáticos y sus derivados. Existen microorganismos específicos que descomponen moléculas tales como el fenol, naftaleno y antraceno que contienen uno, dos y tres anillos de benceno respectivamente. Aparentemente, las bacterias son el grupo microbiano dominante relacionado con la mineralización de compuestos de este tipo, principalmente las especies de *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter* y *Bacillus*; también los estreptomicetos y los hongos, pueden participar en la descomposición de hidrocarburos aromáticos.

Las bacterias relacionadas con la descomposición aeróbica están ampliamente distribuidas y casi todos los suelos contienen organismos que se desarrollan en una gran variedad de estos compuestos. Así encontramos que todos los hidrocarburos aromáticos que se encuentran naturalmente y muchos de los que son sintetizados por los químicos en el laboratorio son metabolizados. Las especies que realizan las transformaciones no son específicas para el sustrato, ya que utilizan azúcares sencillos o ácidos orgánicos así como los hidrocarburos. (Edwards, H.V. 1970).

Es difícil hacer una consideración del metabolismo de aromáticos debido al desconcertante conjunto de productos naturales y sintéticos que son atacados. Sin embargo, aunque las fases iniciales de las vías metabólicas de degradación son diferentes, las reacciones se orientan en una dirección tal que sólo se producen pocos intermediarios comunes, los cuales son entonces metabolizados mediante unos cuantos procesos esencialmente semejantes. Los intermediarios más comunes son el catecol, ácido protocatéquico y, en menor grado, el ácido gentísico. (Leahy, J.G. y R.R. Colwell. 1990).

El concepto de una concentración máxima o de un umbral, para la degradación de hidrocarburos, puede aplicarse también a los ecosistemas terrestres.

La importancia en determinar que tan rápido se consume un hidrocarburo por biodegradación, lo cuál resulta en el incremento del potencial de oxidación de hidrocarburos, se conoce como adaptación. (Song, H.G. y R. Bartha. 1990).

Los tres mecanismos por los cuales puede ocurrir la adaptación son :

- 1) Inducción y/o desrepresión de enzimas específicas.
- 2) Cambios genéticos, los cuales resultan en nuevas capacidades metabólicas.
- 3) Selección de organismos enriquecidos, capaces de transformar los compuestos de interés. (Spain, J.C. et al. 1980). (Spain, J.C. y P.A. van Veld. 1983).

Existen ciertos factores que limitan la biodegradación de compuestos aromáticos :

- I) Cantidad de oxígeno disponible
- II) Cantidad disponible de nutrientes. el nitrógeno, el fósforo y el hierro tienen un efecto definitivo sobre el proceso.
- III) Temperaturas bajas. Abajo de los 10°C se limita grandemente el proceso de degradación.
- IV) Otros. En determinadas situaciones, la humedad y los pH extremos pueden constituirse en factores limitantes. (Schaeffer, T.L. et al. 1979).

2.2 ESTRATEGIAS BIOQUIMICAS PARA EL CATABOLISMO DE COMPUESTOS AROMATICOS.

La degradación microbiana o biodegradación de hidrocarburos, significa el catabolismo del mismo a compuestos de menor peso molecular o a la transformación a compuestos más polares con un número de carbono igual a la del compuesto original. La habilidad de los microorganismos para utilizar hidrocarburos ha sido conocida desde finales de 1800. (Atlas, R.M. 1978).

Desde 1946, Zobell (Zobell, C.E. 1946), estableció que cerca de 100 especies de bacterias, levaduras y hongos, tienen habilidad de degradar hidrocarburos. Algunas especies representativas son capaces de atacar uno o más hidrocarburos; y, desde entonces, se han reportado muchos géneros y especies adicionales.

Sin embargo, los primeros trabajos se enfocaron sobre la microbiología y fisiología del fenómeno, y no fue sino hasta finales de 1950 y principios de 1960, que se realizaron gran cantidad de investigaciones sobre los mecanismos microbianos de oxidación de hidrocarburos, las cuales permitieron sentar las bases teóricas, contruir modelos bioquímicos, así como generar al respecto, algunas conclusiones de aplicación general.

Para obtener energía, los microorganismos deben romper el anillo del hidrocarburo y convertir los productos de la ruptura en sustratos que se incluyen en la vía metabólica relacionada con la producción de energía y biosíntesis. La abertura del anillo casi siempre requiere de la adición de oxígeno que proviene del O₂, lo cual se ha confirmado porque se ha encontrado que parte del O₂ marcado proporcionado en pruebas experimentales aparece en el producto. Esta necesidad por O₂ determina que los microorganismos involucrados sean aerobios. (Pawliowsky, V. y J.A. Howell. 1973).

Ahora bien, aunque las fases iniciales de las vías metabólicas de degradación son diferentes, las reacciones se orientan en una dirección tal que sólo se producen pocos intermediarios comunes los cuales son metabolizados por unos cuantos procesos esencialmente semejantes; siendo el catecol, ácido protocatéquico y en menor grado el ácido gentísico los intermediarios más comunes (Alexander, M. 1978); cuyas estructuras se muestran en la **Fig. 2.1**.

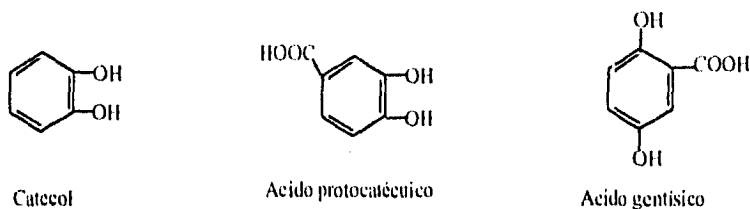


Fig. 2.1 Intermediarios comunes en las vías metabólicas de degradación de compuestos aromáticos.

La primera fase del metabolismo aromático es, con frecuencia, la modificación o eliminación de sustituyentes en el anillo de benceno y la introducción de grupos hidroxilo. Se establecen varias generalizaciones para esta primera fase, las cuales son necesarias a la luz de la cantidad y diversidad de contaminantes y de aromáticos naturales.

- Los grupos metilo son convertidos a grupos carboxilo antes de la ruptura del anillo, reacción que se realiza gradualmente. (Véase A el la **Fig. 2.2**).



Sin embargo, algunas veces el metilo no es eliminado antes de que el anillo sea abierto.

- Con frecuencia, pero no siempre, el carboxilo es eliminado antes de la ruptura del anillo.

- El metoxilo es reemplazado por un hidroxilo y da lugar a formaldehído. (Véase B en la **Fig. 2.2**).



- Las cadenas alifáticas largas son acortadas para producir un residuo con uno o dos átomos de carbono menos; esto ocurre gradualmente, casi siempre, por β -oxidación.



- Los cloros presentes en muchos herbicidas son sustituidos por hidroxilos o hidrógenos, o bien permanecen en el anillo hasta después de que éste es abierto para ser luego eliminados.

- Los grupos nitro (NO₂) característicos de algunos pesticidas y contaminantes industriales pueden ser sustituidos por hidroxilos (Véase C en la Fig. 2.2) y aparecen entonces como nitrito; los sustituyentes nitro pueden ser también reducidos a un grupo amino (-NH₂). Finalmente, los sustituyentes son modificados o eliminados y se agregan hidroxilos, dando origen a los intermediarios centrales. Las reacciones representativas se ilustran en la Fig. 2.2.

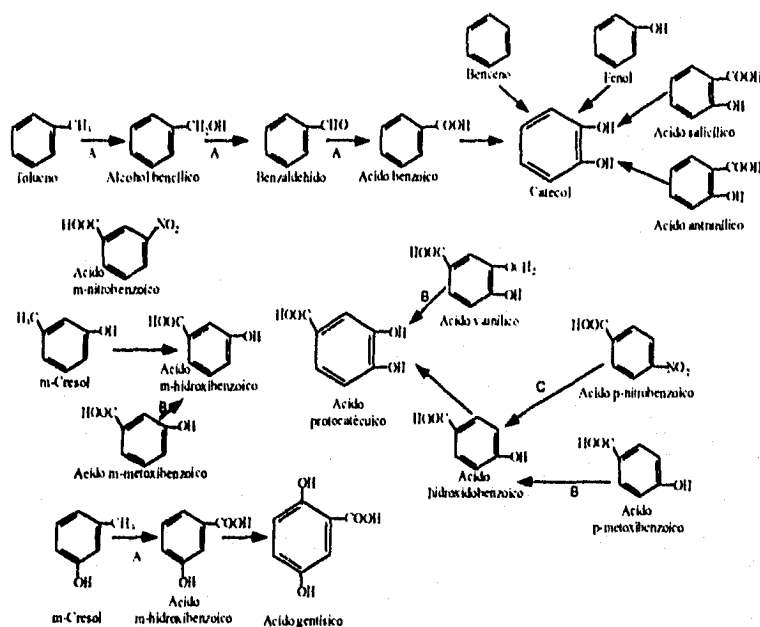


Fig. 2.2 Etapas iniciales en la biodegradación de varios compuestos aromáticos

Los tres intermediarios centrales son degradados por cinco vías metabólicas esencialmente semejantes, como se muestra en la Fig. 2.3. Los cinco productos de esta fase (los ácidos succínico, fumárico, pirúvico y acético así como el acetaldehído) son fácilmente utilizados por los microorganismos.

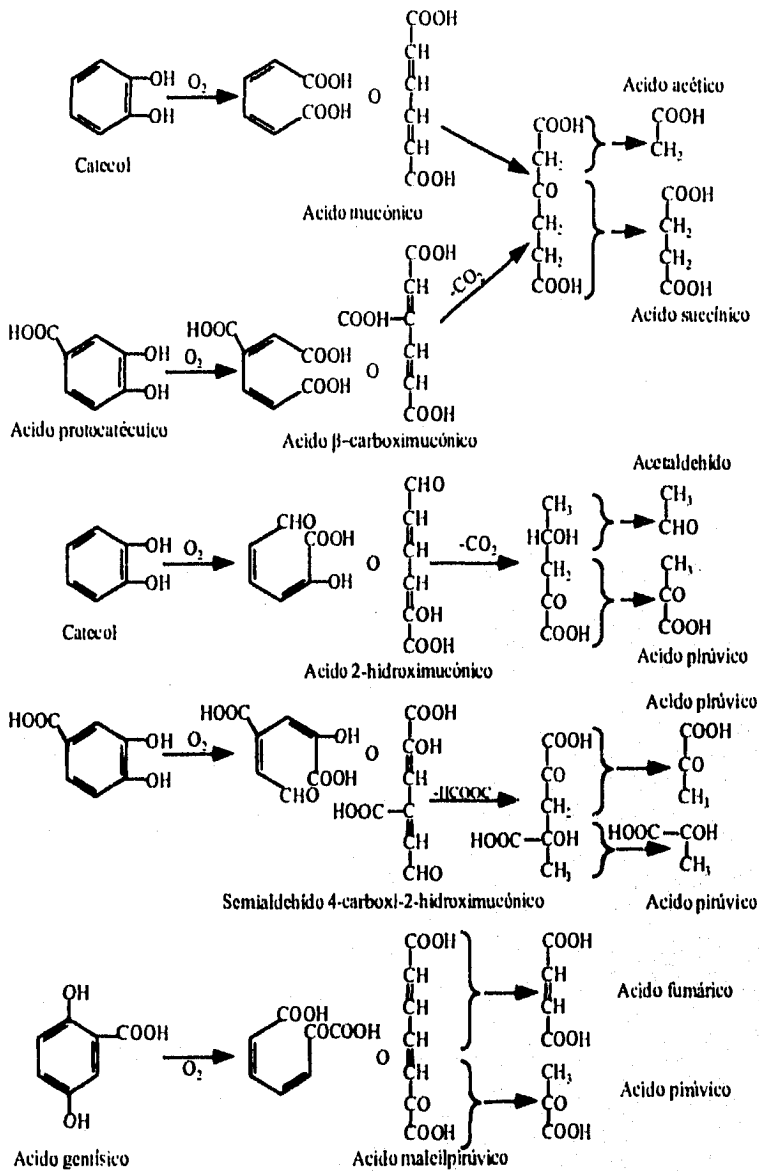


Fig. 2.3 Vías metabólicas de la ruptura de los anillos de benceno.

En el caso de los hidrocarburos monoaromáticos, estos son oxidados hasta catecol en uno o varios pasos.

El anillo aromático dihidroxilado es fragmentado por una segmentación en posición "orto" resultando en un ácido cis-cis mucónico. Este es posteriormente metabolizado hasta ácido β -cetoadípico, el cual es transformado oxidativamente en ácido succínico y Acetil CoA, intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico. En forma alterna, el anillo de catecol puede ser abierto por la fragmentación en posiciones "orto" y "meta" dependiendo de la especie y el sustrato. La ruta "orto" involucra la fragmentación del anillo entre los grupos hidroxilo, mientras que la ruta "meta" involucra la fragmentación del enlace localizado entre un átomo de carbono conteniendo un hidroxilo y otro átomo de carbono adyacente no hidroxilado. (Beltrame, P. et al. 1988).

En el caso de los catecoles sustituidos se utiliza por lo general la ruta "meta"; como se observa en la Fig. 2.4. La fragmentación en la posición "meta" produce un semialdehído cis-cis mucónico, generándose posteriormente ácido fórmico, pirúvico y acetaldehído. (Dapaah, S.Y., y G.A. Hill. 1992).

En el caso de los hidrocarburos monoaromáticos con sustituyentes metil, tales como el tolueno y el xileno, el ataque enzimático inicial puede ser directamente en el anillo aromático o en el grupo metilo. (Harayama, S. y R.H. Don. 1985).

La oxigenación del anillo aromático parece ser el mecanismo más común de degradación por parte de los microorganismos. (Yang, R.D. y E.A. Humphrey. 1975).

Los pasos iniciales en el catabolismo de hidrocarburos aromáticos, por bacterias y hongos, involucran la oxidación de los sustratos por oxigenasas; para lo cual, se requiere oxígeno molecular. Las condiciones aeróbicas son por tanto, necesarias para esta ruta de oxidación microbiana de hidrocarburos en el medio ambiente. (Yamada, K. et al. 1963).

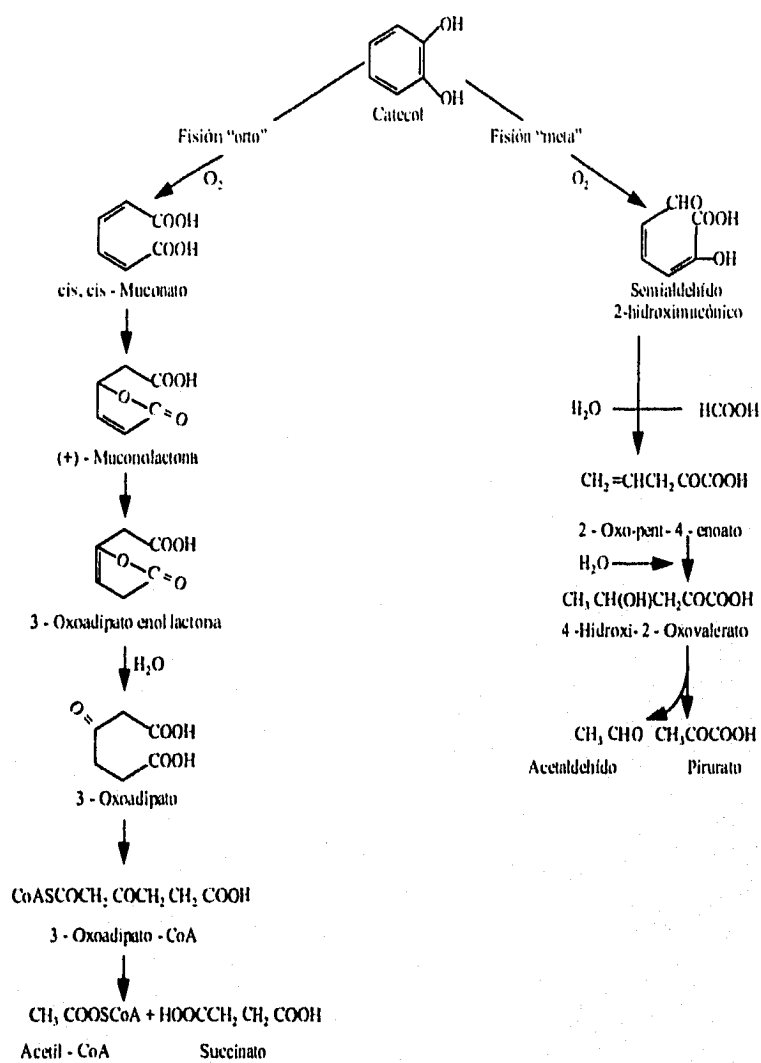


Fig. 2.4 Rutas para la degradación microbiana de catecol.

En las rutas bioquímicas para el catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos, la presencia de oxígeno es necesaria como aceptor de electrones y para la inserción del mismo durante la hidroxilación y división del anillo. (Rozich, A.F. y J.R. Colvin. 1986).

Los hidrocarburos son sustratos orgánicos completamente reducidos que son fundamentalmente metabolizados de una manera oxidativa. Al respecto, se ha generado cierta controversia en cuanto a si el oxígeno es absolutamente requerido para la biodegradación de hidrocarburos o si ésta puede realizarse bajo condiciones anaeróbicas. La evidencia actual sugiere que en el mejor de los casos, la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos en la naturaleza se lleva acabo a tazas despreciables.

Se han publicado trabajos sobre degradación anaeróbica en ecosistemas naturales (Dagley, S. 1978). En estos trabajos se sugiere la utilización por parte de los microorganismos de nitratos y sulfatos como aceptores finales de electrones; sin embargo, el mecanismo no ha sido confirmado bioquímicamente y los criterios usados para la evaluación de la degradación anaeróbica de hidrocarburos han sido generalmente inadecuados para establecer conclusiones definitivas (Boyd, S.A. y D.R. Shelton. 1984); por un lado, se carece de evidencia exhaustiva que permita la exclusión completa del oxígeno, y por otro lado, no se han presentado evidencias químicas que demuestren que los hidrocarburos han sido degradados bajo esas condiciones.

Para fines prácticos, se puede afirmar que la biodegradación completa de hidrocarburos requiere la presencia de oxígeno molecular. La importancia del oxígeno es evidente por el hecho de que las principales rutas metabólicas utilizadas para la degradación de aromáticos por microorganismos, requieren la participación de enzimas conocidas como oxigenasas y por ende de oxígeno molecular. (Reine, K.W. y H.J. Knackmuss. 1980.)

La importancia de la biodegradación anaeróbica, de hidrocarburos aromáticos en el medio ambiente es desconocida, y se requieren estudios adicionales para elucidar las vías anaeróbicas y la genética de las mismas. (Choteau, J. et al. 1962).

El metabolismo aeróbico de hidrocarburos aromáticos es bien conocido y también que ciertos plásmidos llevan genes que codifican para muchas enzimas degradadoras. Aunque no hay información sobre la base genética en el sistema anaeróbico, no se puede excluir el posible cambio en los cromosomas y en los plásmidos que pueden ocurrir entre especies pertenecientes tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos. (Helinski, D.R. 1985).

2.3 RUTAS CENTRALES E INTERMEDIARIOS CLAVE.

Una característica de las rutas catabólicas de los hidrocarburos, es la conducción de diversas estructuras de sustratos dentro de un número limitado de rutas centrales (Hopwood, D.A. 1989); tal y como se muestra en la Fig. 2.5.

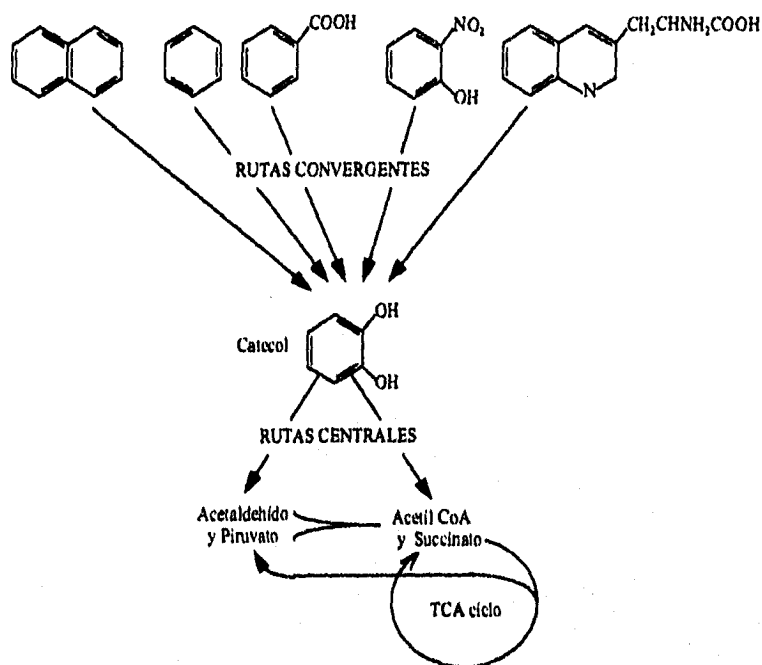


Fig. 2.5. Metabolismo de hidrocarburos aromáticos. Diversos hidrocarburos aromáticos son transformados a catecol, uno de los intermediarios clave de degradación de aromáticos, que es además metabolizado por cualquiera de las rutas centrales a piruvato y acetaldéhidó o a succinato y Acetil-CoA. Que son subsecuentemente degradados a CO₂ y H₂O por el ciclo del ácido tricarbóxico.

Lo anterior se realiza por la actividad de un gran número de enzimas que llevan acabo las reacciones iniciales en las rutas catabólicas y que colectivamente son capaces de atacar un amplio rango de sustratos. Aunque el espectro de sustratos y de enzimas iniciales es amplio, las reacciones que se llevan acabo son limitadas. En el catabolismo aeróbico de moléculas aromáticas, estas reacciones, generalmente llevan a la formación de intermediarios dihidroxi aromáticos que tienen grupos hidroxilo en dos carbonos adyacentes en el anillo aromático (orto) o en carbonos opuestos del anillo (meta) y son intermediarios clave para su ingreso dentro de las rutas centrales. **Fig. 2.6.**

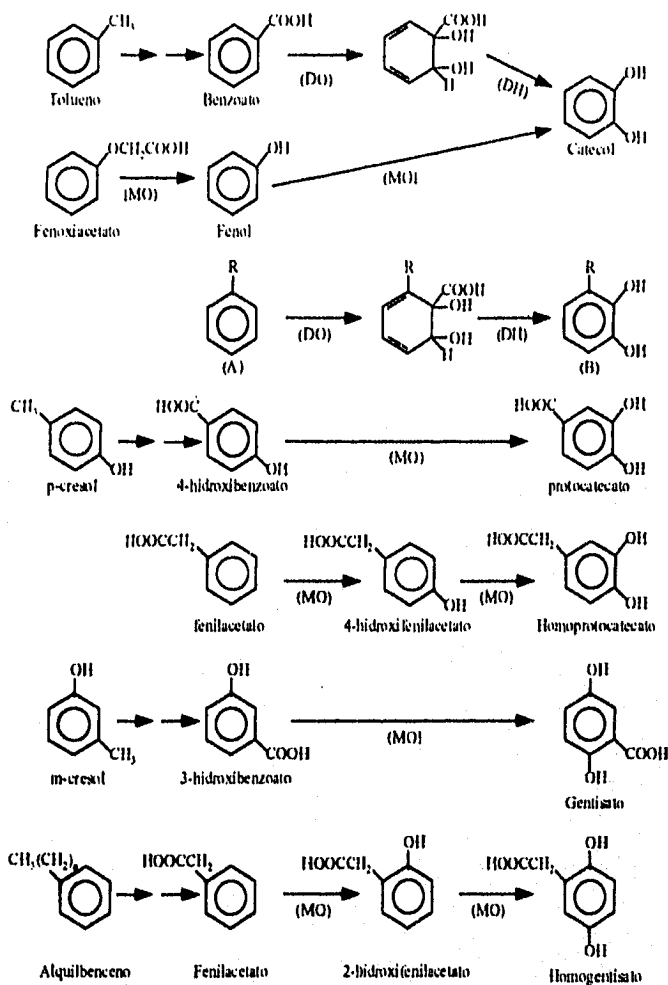


Fig. 2.6 Rutas convergentes que conducen a los hidrocarburos aromáticos a una o cinco rutas intermediarias clave a saber ; catecol (o catecoles sustitutos), protocatecol, homoprotocatecol, gentisato y homogentisato. La adición de grupo(s) hidroxilo a el núcleo de benceno se lleva acabo por una monooxigenasa (MO) o dioxigenasa (DO) más dihidrodiol dihidrogenasa (DH). (A) : tolueno (R = CH₃); isopropilbenceno (R = CH₂CH₃). (B) : 3-metilcatecol (R = CH₃) : 3-isopropilcatecol (R = CH₂CH₃).

La formación de fenoles dihidricos (compuestos aromáticos que tienen dos grupos hidroxilo) parece ser una importante estrategia bioquímica para estabilizar la firme estructura química resonante de los anillos aromáticos a fin de facilitar las rupturas subsecuentes. Un camino para formar fenoles dihidricos es mediante la dioxigenación del anillo aromático implicando la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular para producir *cis*-dioles seguida por dihidrogenación. (Hopwood, D.A. 1989). La estructura y función de las dioxigenasa del anillo aromático se muestran en la Fig. 2.7. Nótese que el simple consumo de NADH por dioxigenación del núcleo del benceno es regenerado por la subsecuente dihidrogenación en el dihidrodiole

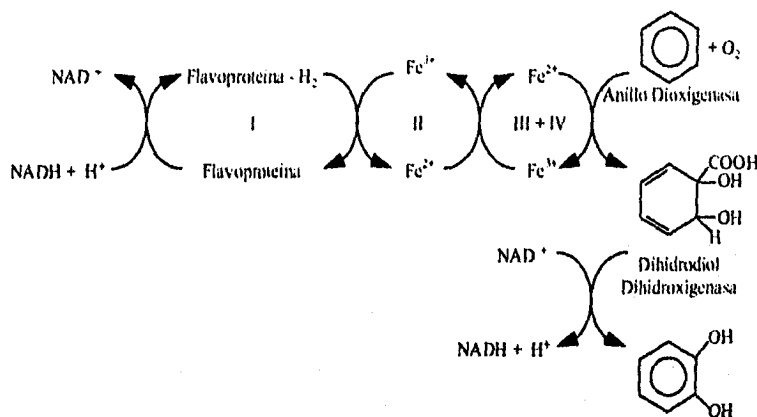


Fig. 2.7. Formación de fenoles dihidricos catalizados por una dioxigenasa hidroxilante y una dihidrodiole dihidrogenasa. La dioxigenasa hidroxilante produce dihidrodioles por la introducción de dos átomos de oxígeno dentro del anillo aromático. Ello consiste de tres o cuatro polipéptidos que al mismo tiempo forman una pequeña cadena de transferencia de electrones que transfieren electrones del NADH a el oxígeno. El componente I es una flavoproteína; el II es una ferredoxina y contiene un grupo ($2\text{Fe}-2\text{S}^*$). (S^* es el azufre inorgánico en el grupo hierro-azufre). Los componentes III y IV forman la oxigenasa terminal y contienen grupos ($2\text{Fe}-2\text{S}$). Los pesos moleculares de las subunidades de los polipéptidos de diferentes anillos dihidroxilados son semejantes: la oxigenasa terminal generalmente consiste de dos polipéptidos de 20 a 50 kD, y estas ferredoxinas usualmente son pequeños polipéptidos. Los dihidrodioles son oxidados a fenoles dihidricos por dihidrodiole dihidrogenasas que son simples enzimas componentes.

El catabolismo de sustratos aromáticos con más sustituyentes complejos, puede algunas veces involucrar, pasos adicionales que procesen los grupos sustituyentes; y la formación de los fenoles dihidrúricos centrales puede implicar FAD conteniendo monooxigenasas. (Young, J.L. et al. 1995). Ejemplos de estas rutas se presentan en la Fig. 2.6.

Rutas alternativas a fenoles dihidrúricos para compuestos aromáticos con grupos sustituyentes sulfuro y nitro se muestran en la Fig. 2.8.

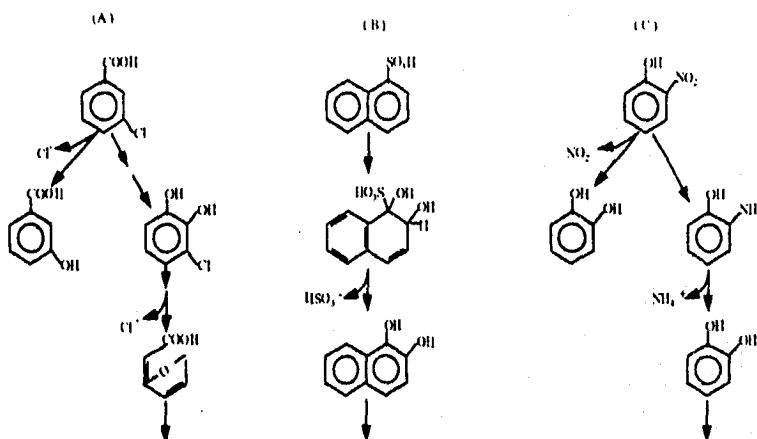


Fig. 2.8 Reacciones posibles para la eliminación de sustituyentes de los anillos aromáticos : (a) 3-clorobenceno, (b) ácido naftalen-1-sulfónico; (c) o-nitrofenol.

La fisión de los anillos aromáticos dihidroxilados es llevada a cabo por dioxigenasas cuando incorporan dos átomos de oxígeno Fig. 2.9. El catecol y el protocatecol pueden romperse de dos modos distintos : entre los dos grupos hidroxilos (orto o ruptura intradiol) o proximal al grupo hidroxilo (meta o ruptura extradiol). En el caso del gentisato o homogentisato, cuyos dos grupos hidroxilos están en la posición para, el anillo se abre entre el carbono 1 y 2 por la acción del gentisato 1,2 dioxigenasa o el homogentisato 1,2 dioxigenasa respectivamente.

Las reacciones de ruptura del anillo del gentisato y homogentisato mecanísticamente semejan fisión meta.

La fisión meta requiere dioxigenasas hierro ferrosas no hem como grupos prostéticos, mientras que las enzimas de la fisión orto, involucran hierro férrico no hem. Este hierro es esencial para la reacción, aunque su papel preciso no está del todo claro (Harayama, S. et al. 1987).

Después de que el anillo se rompe, los metabolitos intermediarios, llegan directamente al ciclo del ácido tricarbóxico por una serie de enzimas que comprenden la ruta central.

Los compuestos haloaromáticos insustituídos son metabolizados por rutas de ruptura orto (β -cetoadipato) **Fig. 2.9** en donde el catecol y el protocatecol son rotos por el catecol 1,2 dioxigenasa y el protocatecol 3,4 dioxigenasa respectivamente y los productos de la ruptura cis-cis muconato y 3-carboxi-cis-cis muconato son transformados vía Intermediario común, β -cetoadipato enol-lactona a succinato y acetil-CoA. **Fig. 2.10.**

Las rutas de ruptura orto no son procesos usuales para aromáticos alquílicos, porque muchas enzimas de ruptura orto tienen muy baja afinidad para alquilatecoles, e incluso, si tales compuestos son rotos, los intermediarios tienen un camino sin salida, por lo que usualmente, se acumulan en esta ruta. (Sokol, W. y A. Howell. 1981).

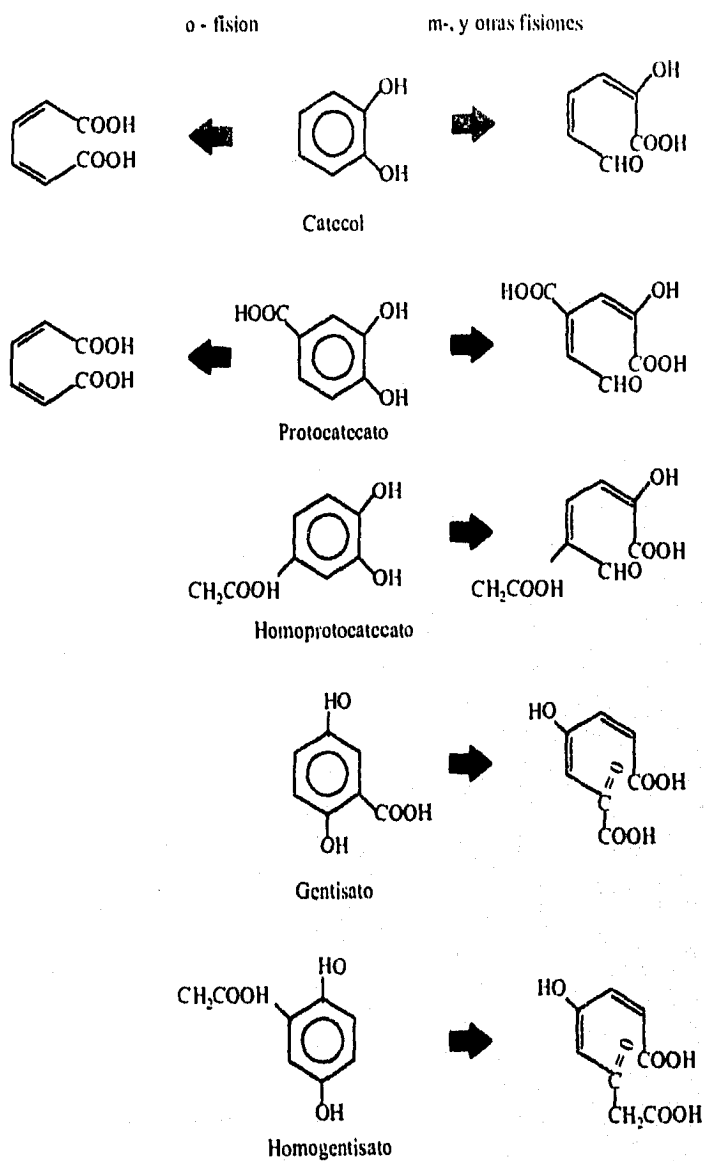


Fig. 2.9

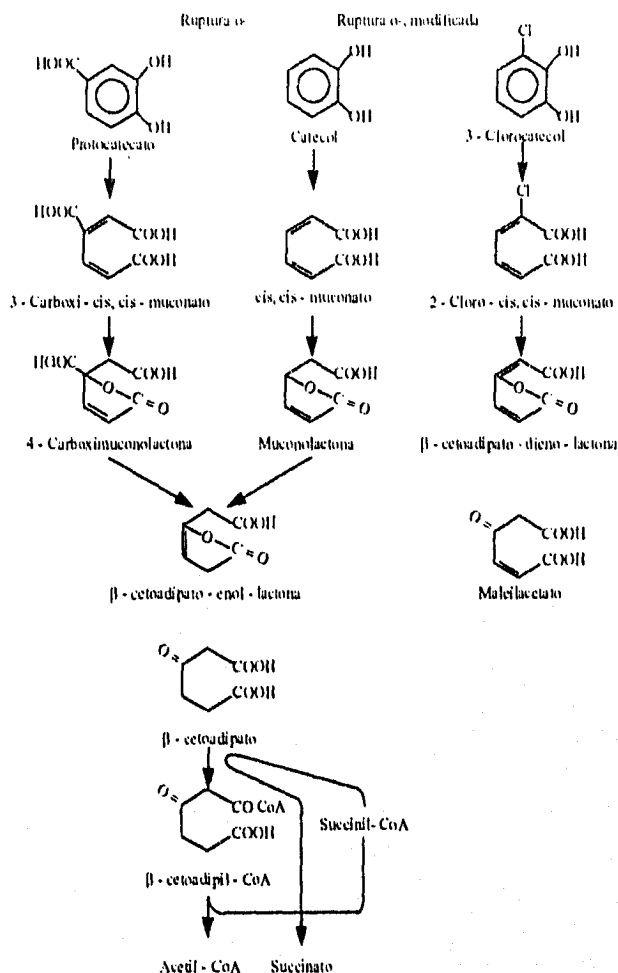


Fig. 2.10 Rutas del β -cetoadipato para la degradación de catecol, protocatecato y 3-clorocatecol. La ruta orto del β -cetoadipato es una ruta metabólica que transforma al catecol o al protocatecato a succinato y acetil CoA. Después de la fisión orto del anillo aromático, (ruptura del anillo por intradiol dioxigenasas), el catecol y el protocatecato son procesados a un intermediario común β -cetoadipato enol-lactona y transformado por completo a succinato y acetil CoA. La ruta para la degradación del 3-clorocatecol es ligeramente diferente y por lo tanto es designada a la ruta orto.

2.4 ORGANIZACION Y REGULACION DE GENES PARA EL CATABOLISMO DE HIDROCARBUROS AROMATICOS.

Los recientes descubrimientos en cepas de *Pseudomonas putida* con relación a la información genética para la síntesis de enzimas, responsables para la degradación de algunos hidrocarburos, señalan que es codificada por elementos genéticos extracromosomales (plásmidos). (Shields, S.M. et al. 1986). Esta información puede ser transmitida entre microorganismos individualmente, en cepas o en especies iguales, y en esta forma la competencia genética para degradar algunos hidrocarburos puede ser transmitida en el medio ambiente. También existe la posibilidad de la construcción de nuevas cepas por medio de la introducción de plásmidos, con lo cual las especies adquieren la capacidad degradativa.

El DNA del plásmido puede jugar un papel importante en la adaptación genética, ya que presenta una gran variedad de formas de DNA, el cual puede ser transferido, vía conjugación, pudiendo impartir nuevos fenotipos, incluyendo la habilidad de oxidación de hidrocarburos.

La exposición de poblaciones microbianas a hidrocarburos, puede favorecer una ventaja selectiva de cepas que poseen plásmidos que codifican enzimas para el catabolismo de hidrocarburos y en consecuencia un incremento en la totalidad de plásmidos en la comunidad microbiana.

Una evidencia de la importancia de los plásmidos en la adaptación de hidrocarburos, ha sido proporcionado en algunos estudios (Harayama, S. y Don R.H., 1985), en los cuales una gran frecuencia y/o multiplicidad de plásmidos han sido observados en bacterias aisladas de ambientes contaminados por hidrocarburos así como de sitios no contaminados, (Burton, N.F., M.J. Day y A.T. Bull. 1982).

Existe la idea de que el crecimiento de microorganismos a expensas de los hidrocarburos, involucra tres procesos específicos :

- 1) La Interacción de las células con el sustrato insoluble por adherencia en la interfase aceite-agua por pseudosolubilización de la fuente de carbono, o por disolución del hidrocarburo en la fase acuosa.

2) La introducción de oxígeno molecular dentro de los hidrocarburos y su consecuente biotransformación a una forma que puede entrar en la vía metabólica de la célula microbiana.

3) La expresión de señales específicas regulatorias que controlan la vía metabólica.

Han sido documentados muchos casos en los que se señalan la participación de plásmidos en la degradación de hidrocarburos aromáticos, incluyendo una variedad de hidrocarburos clorados, (Leahy, J.G. y R.R. Colwell, 1990).

Las posibilidades para explicar la presencia de plásmidos que codifican genes que permiten el crecimiento en cultivos con hidrocarburos son :

1) El plásmido codifica los genes que se requieren para la adherencia del hidrocarburo.

2) El plásmido codifica los genes que involucran la protección de las células hacia el potencial tóxico de los compuestos.

3) El plásmido codifica los genes que se requieren para que el hidrocarburo sea el sustrato para el crecimiento en cultivos. (Hellinski, D.R. 1985).

Muchas rutas catabólicas son determinadas por plásmidos conjugativos. Estos plásmidos pueden fácilmente transferir información dentro de nuevos microorganismos hospederos y de este modo, expandir el potencial metabólico de otros miembros de un ecosistema. Los plásmidos conjugativos son desde luego, agentes importantes de cambios genéticos y de evolución en los microorganismos, y pueden mejorar y producir a la vez para diferentes organismos grupos de genes que por medio de mutaciones puedan tener nuevas funciones metabólicas específicas. En un ambiente rico de compuestos de partículas orgánicas, existe una presión selectiva para mantener y adquirir un plásmido específico a la ruta catabólica correspondiente. (Harayama, S. y R.H. Don, 1985).

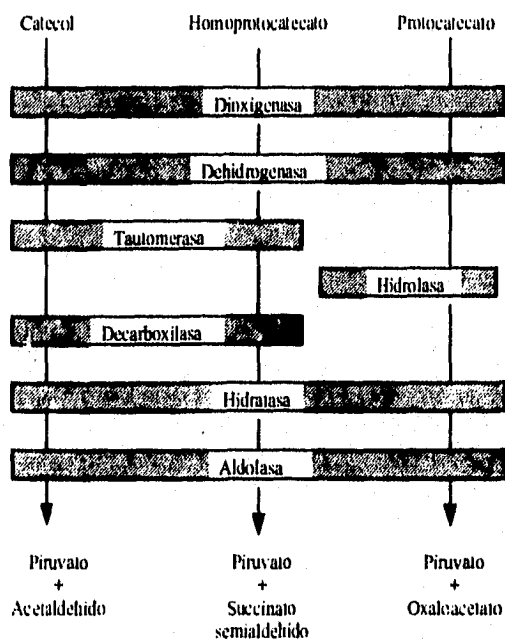
La ruta del β -cetoadipato para la degradación de benzoato y protocatecato (**Fig. 2.10**), es usualmente cromosomal. Esto sugiere que la posesión de esta ruta, puede beneficiar a ciertos microorganismos por un largo periodo de tiempo. La importancia primordial probable del β -cetoadipato es también soportado por el hecho de que muchas bacterias del suelo presentan respuestas quimiotácticas al benzoato o al protocatecato y β -cetoadipato. (Hellinski, D.R. 1985).

En contraste a la ruta normal del β -cetoadipato, las rutas del β -cetoadipato para la modificación de clorocatecoles (Fig. 2.10) son codificadas por plásmidos. Comparaciones de secuencias de genes isofuncionales, de enzimas degradadoras de clorocatecol, muestran que los genes catabólicos son homólogos, aunque no idénticos.

Muchos organismos presentes en el suelo poseen dos o más rutas para la degradación de un sustrato, sin embargo, en alguna situación dada, sólo una de estas rutas es inducida.

Muchos plásmidos llevan genes catabólicos y también pueden estar organizados en operones. Un operon, usualmente codifica una unidad funcional bioquímica, por ejemplo, en el caso del plásmido TOL (tolueno), los genes específicos para la oxidación del tolueno a benzoato están organizados dentro de un operon (el operon "superior"), y aquellos codificados para la transformación del benzoato a piruvato y acetaldehído vía ruptura meta de catecol están organizados dentro de un segundo operon (el operon "bajo" de la ruptura meta). (Jeenes, D.J. et al. 1982). Como se muestra en la Fig. 2.11.

(A) Ruta dehidrogenativa de la ruptura "m"



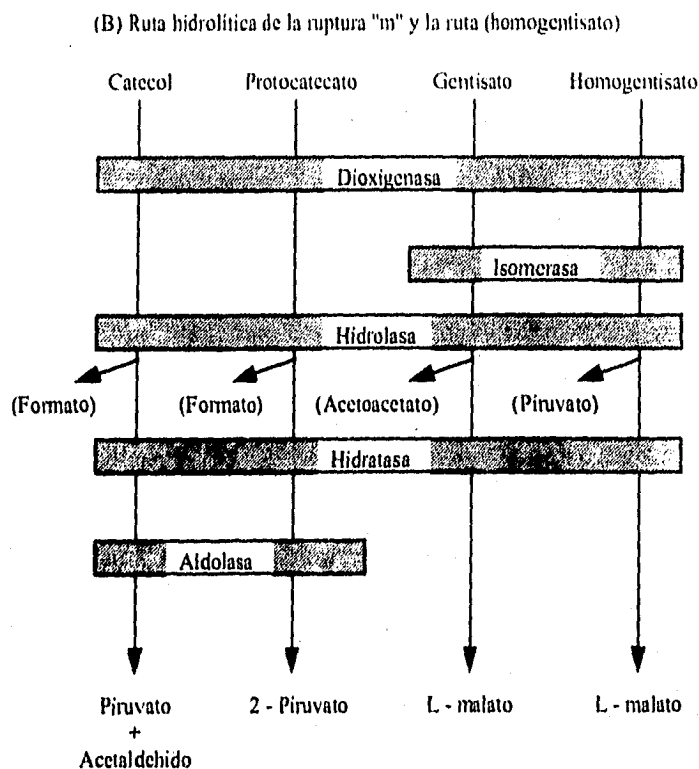


Fig. 2.11 Después de la ruptura meta del catecol y (homo) protocatecolato por dioxigenasas, los productos son procesados por dihidrogenasas (A) o hidrolasas (B). La ruta dihidrogenativa para el metabolismo de catecol y homoprotocatecolato, involucra, pasos enzimáticos efectuados por una dihidrogenasa, tautomerasa, descarboxilasa, hidratasa y aldolasa. El protocatecolato es procesado por reacciones enzimáticas similares. La ruta hidrolítica, convierte el producto de fisión del anillo al sustrato de la hidratasa. Las rutas para la degradación del gentisato y homogentisato son similares a aquellas de la ruta hidrolítica de la ruta de ruptura meta con respecto a el orden de reacciones enzimáticas, excepto los productos de ruptura del anillo que pasan por isomerización.

Puesto que muchos sustratos raramente aparecen en determinados ecosistemas, la expresión de genes catabólicos es cuidadosamente regulada para economizar materiales y energía. Tal control se lleva a cabo por sistemas regulatorios.

La evolución de nuevas rutas para metabolizar nuevos compuestos incorporados al medio ambiente, por las actividades industriales del hombre, es facilitada por características importantes de algunas enzimas catabólicas, para sustratos específicos relacionados.

Por último, el metabolismo oxidativo de compuestos aromáticos por microorganismos consiste en la manipulación de los sistemas del anillo de tal modo, que los productos de degradación puedan entrar en los ciclos respiratorios terminales del microorganismo. Esto es realizado por una limitada diversidad de rutas oxidativas. La ruptura del anillo es precedida por hidroxilaciones necesarias para proveer dos grupos hidroxilo al anillo aromático. Estas son usualmente establecidas en la posición orto (catecol, ácido protocatéquico, 1,2-dihidroxi-naftaleno) pero en ciertos casos pueden aparecer en la posición para (ácido gentísico, 2,5-dihidroxipiridina). Cuando en la posición orto el anillo se rompe, entre los carbonos, se adicionan grupos hidroxilo. Cuando esto ocurre en la posición para, el anillo se rompe cerca de una banda adyacente a uno de los átomos de carbono que lleva un grupo hidroxilo. Los compuestos que llevan orientados los grupos hidroxilo a la posición orto o para se convierten en intermediarios clave; existen diversas moléculas orgánicas metabolizadas a través de tales compuestos clave como catecol, ácido protocatéquico, etc; u otros análogos. Las oxidasas que rompen los anillos bencénicos catalizan reacciones en donde un átomo de oxígeno molecular entra directamente dentro del producto oxidado; estas enzimas requieren de hierro ferroso y férrico para su buen funcionamiento. (Sokol. W. 1987).

2.5 MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACION DE FENOL Y COMPUESTOS DERIVADOS.

Existen informes de que varios microorganismos son capaces de crecer en compuestos aromáticos como el benceno, tolueno, fenol, o-cresol, etc.

Marr y Stone, (Marr, E.K. y R.W. Stone. 1961), obtuvieron la primera evidencia de que el catecol está involucrado en la degradación del fenol; subsecuentemente Gibson y sus colaboradores, (Gibson, D.T. 1968), demostraron que el cis-bencen-glicol (cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidroxibenceno), es un compuesto intermediario entre el fenol y el catecol en el metabolismo de una cepa de *Pseudomonas putida*.

Los hidrocarburos sencillos, derivados del fenol, son degradados por los microorganismos mediante un ataque enzimático inicial directo al anillo aromático del grupo metilo; sin embargo la oxigenación al anillo, parece ser el mecanismo más común.

Tanto las bacterias, como los hongos, son relativamente abundantes en el suelo; y miembros de ambos grupos, contribuyen a la biodegradación de hidrocarburos.

Las bacterias, levaduras y hongos filamentosos que participan en la biodegradación de fenol han sido sujetos de estudio, pero parece ser que la capacidad degradativa depende de los ecosistemas y de las condiciones locales del medio ambiente.

En la **Tabla 2.1** se muestran los géneros de microorganismos reportados como degradadores de fenol y de compuestos derivados, aislados de ambientes terrestres.

BACTERIAS	HONGOS
<i>Achromobacter</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Candida</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Geotrichum</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Monilia</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Streptomyces</i>	<i>Trichoderma</i>

Tabla 2.1 Géneros degradadores de fenol y compuestos derivados.

Cerniglia, (Cerniglia et al 1980), observaron que nueve cianobacterias, cinco algas verdes, una alga roja, una alga café y dos diatomeas pudieron oxidar a un compuesto fenólico; en contraste, los protozoarios no han demostrado esa habilidad. Las evidencias no sugieren un significado ecológico para las algas y protozoarios en la degradación de hidrocarburos en el medio ambiente

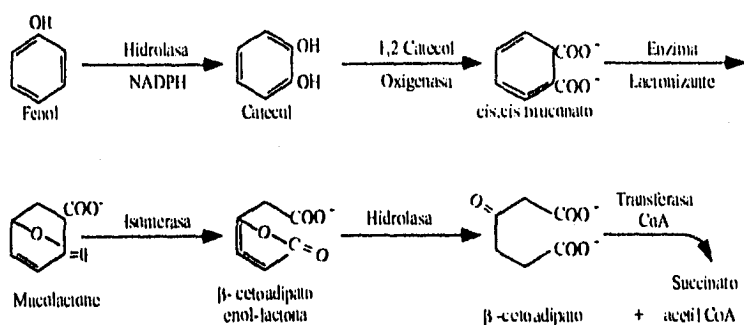
2.6 MECANISMO DE DEGRADACION DE FENOL.

Muchas bacterias aeróbicas y hongos, son capaces de utilizar compuestos aromáticos como la única fuente de carbono y energía. Una ruta típica para metabolizar compuestos aromáticos es la dihidroxilación del anillo de benceno para formar catecol y así abrir el anillo através de una oxidación orto o meta. (Yang, R.D. y E.A. Humphrey. 1975). Como se ilustra en la **Fig. 2.12**.

La bacteria *Pseudomonas putida* degrada el fenol através de la ruta meta. La levadura *Trichosporon cutaneum* degrada al hidrocarburo através de la ruta orto. En la ruta meta, la 2,3 oxigenasa es un sistema inducible. El fenol puede actuar como el inductor. En la ruta orto, el *T. cutaneum* tiene un sistema inducible 1,2 oxigenasa.

En el caso de catecoles sustituidos se utiliza por lo general la ruta "meta"; la fragmentación en la posición "meta" produce un semialdehído cis-cis mucónico, generándose posteriormente ácido pirúvico y acetaldehído. La ruta "orto", es una ruta metabólica que transforma al catecol a succinato y acetil CoA. Después de la fisión orto del anillo aromático, el catecol es procesado a un intermediario común β - cetoalpató enol-lactona y transformado a succinato y acetil CoA.

RUTA ORTO



RUTA META

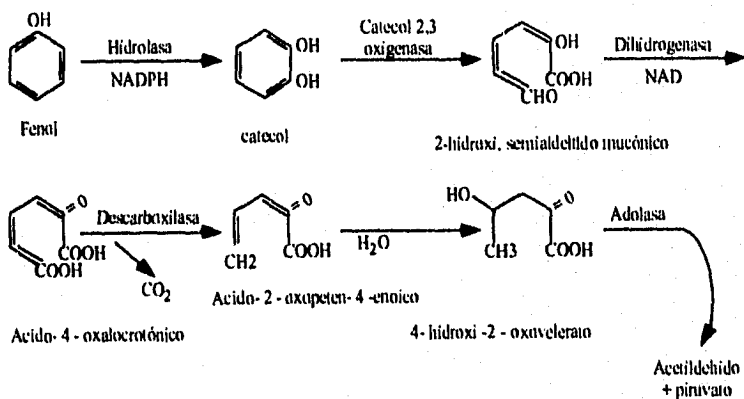


Fig. 2.12 Mecanismo de degradación de fenol.

Capítulo

3

- 3.1 Material
- 3.2 Equipo.
- 3.3 Medios de cultivo.
- 3.4 Reactivos y soluciones.
- 3.5 Aislamiento de microflora.
- 3.6 Caracterización de géneros.
- 3.7 Cuantificación de fenol residual.

Desarrollo experimental

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los materiales, equipos, medios de cultivo, reactivos y soluciones utilizados en la realización de este estudio se muestran a continuación.

3.1 MATERIAL

- Asas bacteriológicas
- Cajas Petri de 10 cm. de diámetro
- Celdas espectrofotométricas
- Espátula
- Gradilla
- Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 ml
- Matraz volumétrico de 50 y 100 ml
- Mechero Bunsen y Fisher
- Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 5, 10, 20 y 50 ml
- Portaobjetos
- Propipeta
- Triples y telas de asbesto
- Tubos de ensaye de 12x75, 13x100, 16x150 y 22x175
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 ml

3.2 EQUIPO

- Autoclave
- Balanza analítica y granataria
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Microscopio óptico

3.3 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar bacteriológico. Merck.
- Agar Biggy. Difco.
- Agar cetrimida. Merck.
- Agar citrato de Simmons. BBL.
- Agar dextrosa Sabouraud. Difco.
- Agar hierro de Kligler. Merck.
- Agar nutritivo. Merck.
- Agar Pseudomonas para detección de fluoresceína. Merck.
- Medio mineral (Primo aislamiento)
- Medio O F de Hugh y Lefson. BBL.
- Medio rojo de metilo Voges-Proskauer. Merck.
- Medio sulfhídrico-indol-movilidad. BBL.

3.4 REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Ácido bórico. R.A. Merck.
- Alcohol-acetona
- Alcohol etílico absoluto. R.A. Merck.
- 4-Aminoantipirina. 98%. Aldrich.
- Alfa-naftol. Merck.
- Cloruro de amonio. R.A. Merck.
- Cristal violeta
- Fenol. R.A. Merck.
- Ferricianuro de potasio. R.A. J.T. Baker.
- Fosfato ácido de potasio. R.A. Merck.
- Fosfato ácido sodio. R.A. Merck.

- Galactosa. R.A. Merck.
- Glucosa. R.A. Merck.
- Hidróxido de amonio concentrado.
- Hidróxido de sodio al 40%.
- Hipoclorito de sodio.
- Lactosa. R.A. Merck.
- Lugol.
- Manosa. R.A. Merck.
- Molibdato de amonio. R.A. Merck.
- Nitrito de cobalto. R.A. Merck.
- Peróxido de hidrógeno. R.A. Merck.
- Rafinosa. R.A. Merck.
- Reactivo de Ehrlich.
- Sacarosa. R.A. Merck.
- Safranina.
- Solución salina isotónica.
- Sulfato de amonio. R.A. Merck.
- Sulfato de calcio. R.A. Merck.
- Sulfato de cobre. R.A. Merck.
- Sulfato de fierro. R.A. Merck.
- Sulfato de magnesio. R.A. Merck.
- Sulfato de manganeso. R.A. Merck.
- Sulfato de zinc. R.A. Merck.

METODOLOGIA

3.5 AISLAMIENTO DE MICROFLORA

Se tomó una muestra de tierra de suelo propio de 5 compañías cuya ubicación se muestra en la **Tabla 3.1**.

<i>COMPANIA</i>	<i>DIRECCION</i>
<i>I</i>	Norte 118 y Norte 45. Col. Industrial Vallejo.
<i>II</i>	Norte 45 # 836. Col. Industrial Vallejo.
<i>III</i>	Norte 45 esquina 146. Col. Industrial vallejo.
<i>IV</i>	Norte 59 y Norte 45. Calz. Atzacapotzalco-La Villa.
<i>v</i>	Poniente 128 y Norte 45. Calz. Atzacapotzalco-La Villa

Tabla 3.1 Ubicación de las compañías.

Para aislar la microflora con capacidad para biodegradar fenol de cada una de las muestras de las compañías arriba mencionadas se procedió de la siguiente manera:

A) Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para aislar microflora capaz de biodegradar fenol se muestra a continuación (Berezkinz, N.E. 1992); cuya formulación para 1000 ml de medio líquido es la siguiente:

Sustancia	Gramos por litro de medio
Fosfato ácido de potasio	3.1×10^{-2}
Fosfato de ácido de sodio	1.9×10^{-2}
Sulfato de amonio	6.1×10^{-3}
Sulfato de magnesio	8.0×10^{-4}
Sulfato de hierro	5.8×10^{-5}
Sulfato de calcio	2.4×10^{-5}
Sulfato de zinc	8.1×10^{-6}
Sulfato de manganeso	7.4×10^{-6}
Acido bórico	1.6×10^{-6}
Nitrato de cobalto	1.2×10^{-6}
Sulfato de cobre	1.0×10^{-6}
Molibdato de amonio	4.2×10^{-7}

A este medio le fueron adicionados 100 mg/l de fenol obteniéndose así un medio específico y selectivo hacia la microflora que fuera capaz de biodegradarlo como única fuente de carbono.

B) Condiciones de esterilización

Se preparó el medio de cultivo mineral con la composición anteriormente mencionada y se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Una vez que el medio se encuentra a temperatura ambiente, se le adiciona asepticamente la cantidad de fenol anteriormente citada.

Para lograr el aislamiento de la microflora de cada una de las muestras se procedió de la siguiente manera:

- 1.- Se tomaron aproximadamente 5 g de muestra de tierra y se suspendieron en solución salina isotónica estéril. Homogeneizar perfectamente
- 2.- Se realizaron diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10,000, utilizando para ello solución salina isotónica estéril.
- 3.- Se vacía 1 ml de cada una de las diluciones de tierra en distintas cajas petri con medio mineral adicionado con 100 mg/l fenol y agar bacteriológico para lograr que el medio sea sólido.
- 4.- Las cajas inoculadas se incubaron a 35°C durante 48 horas para obtener el desarrollo de las colonias.
- 5.- Se aislaron las colonias que desarrollaron en las condiciones anteriormente citadas, para su posterior resiembra en cajas petri con medio mineral adicionado con 100 mg/l fenol y agar bacteriológico; utilizando una caja para cada colonia seleccionada, se incubaron las cajas 48 horas a 35°C.

3.6 CARACTERIZACION DE GENEROS

Una vez seleccionadas las colonias y antes de sembralas como se indica en el paso número 5, fue necesario realizar tinciones Gram con el fin de verificar sus características microscópicas y confirmar la pureza de las mismas.

Todas las colonias generadas por bacilos Gram negativos sin la presencia de contaminantes, fueron aisladas e inoculadas en una serie de tubos con medios diferenciales (2 para cada cepa), para realizar las pruebas bioquímicas, a fin de identificar el género de la colonia aislada. (Balows, A. et al. 1991), (Bergey's Manual. 1984). Las pruebas bioquímicas que se utilizaron fueron las siguientes:

- Catalasa
- Oxidasa
- Motilidad
- O-F glucosa
- Producción de H₂S e indol
- Citrato de Simmons
- Rojo de metilo
- Voges-Proskauer

Las colonias que presentaron formas levaduriformes al observarlas al microscopio y que no presentaron contaminación por otro tipo de microorganismo se sembraron en agar Biggy y Sabouraud, para posteriormente realizar un zimograma (fermentación de carbohidratos), a fin de identificar el género; los carbohidratos empleados para esta prueba bioquímica fueron los siguientes :

- Glucosa
- Sacarosa
- Galactosa
- Rafinosa
- Lactosa
- Manosa

6.- Cada cepa una vez que fue caracterizada, se resembró en medio mineral adicionado con 100 mg/l fenol. Se incubaron 48 horas a 35° C.

7.- De los cultivos anteriores, se realizaron resiembras sucesivas, incrementando la concentración de 200-800 mg/l fenol bajo las mismas condiciones de incubación.

8.- Para comprobar el desarrollo de los microorganismos en las diferentes concentraciones se observó turbidez y se realizaron tinciones Gram para comprobar sus características microscópicas y pureza de las mismas; así, como su abundancia en el campo.

9.- Se seleccionaron las cepas que presentaron mayor actividad degradadora y se sometieron ahora a concentración de 100 mg/l fenol en matraces Erlenmeyer con medio mineral. Se incubaron a 35° C bajo agitación constante.

10.- De los cultivos anteriores se realizó una resiembra ahora a una concentración de 200 mg/l fenol bajo las mismas condiciones de incubación.

11.- Simultáneamente se sometieron las cepas a un residuo fenólico cuya concentración fue de 315 mg/l fenol bajo las mismas condiciones de incubación.

12.- Se tomaron muestras del sobrenadante de cada matraz a las 24, 48 y 72 horas de incubación para poder determinar así la concentración de fenol residual mediante un método espectrofotométrico.

13.- Una vez realizada la evaluación anterior, se seleccionaron las cepas que presentaron mayor actividad degradadora y se sembraron en matraces Erlenmeyer ahora a una concentración de 300 mg/l fenol y así sucesivamente hasta una concentración de 500 mg/l fenol bajo las mismas condiciones de incubación como se indica en el punto número 9.

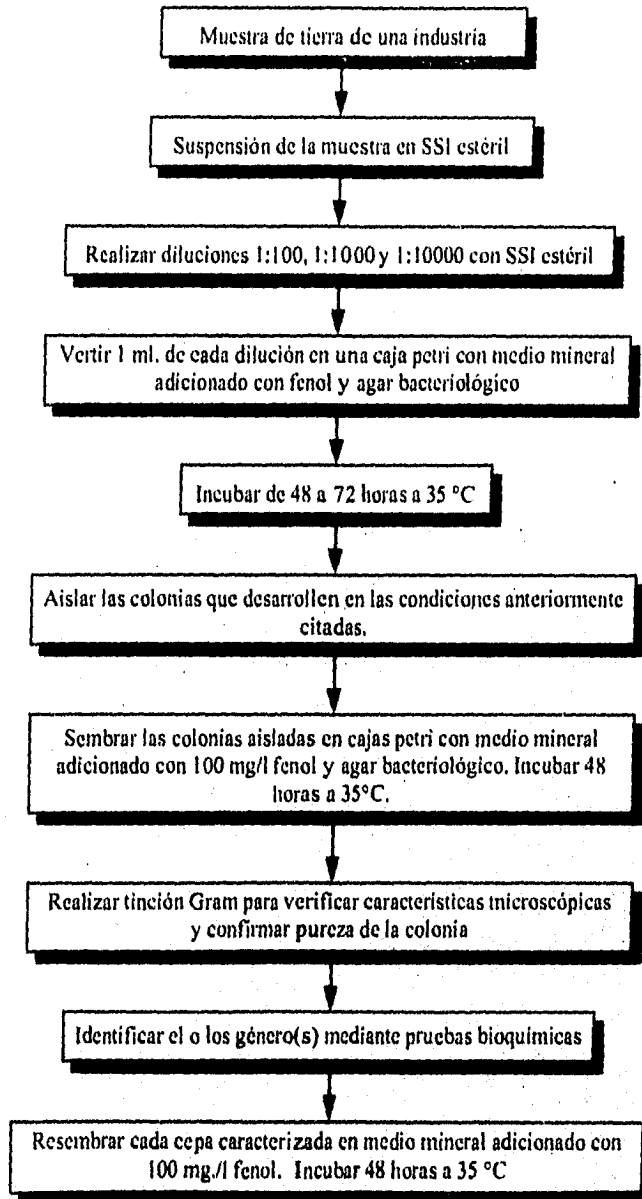
14.- Por último, se procedió a la cuantificación de fenol residual de acuerdo a lo que se indica en el punto número 12.

3.7 CUANTIFICACION DE FENOL RESIDUAL

La cuantificación de fenol residual se realizó por medio de una técnica espectrofotométrica (Standard Methods. 1992), cuya metodología se presenta a continuación:

- a) Preparar una solución patrón de fenol (0.1g/100 ml).
- b) Tomar alícuotas de 10, 20, 30, 40 y 50 ml de la solución patrón; aforar a 100 ml.
- c) Tomar 1 ml de cada concentración de la solución patrón, así como de cada una de las muestras de los matraces Erlenmeyer y verter en un vaso de precipitados, uno para cada cual.
- d) Ajustar el pH a 10 a cada vaso de precipitados con NH_4OH . Realizarlo potenciométricamente.
- e) Añadir 5 ml de NH_4Cl (20 g/l) a cada vaso de precipitados.
- f) Trasvasar el contenido de cada vaso de precipitados a un matraz volumétrico de 100 ml. (No aforar).
- g) Añadir 2 ml de 4-aminoantipirina (2g/100ml).
- h) Añadir 2 ml de ferricianuro de potasio (8g/100ml).
- i) Aforar a 100 ml.
- j) Dejar desarrollar color durante 15 minutos.
- k) Leer en un espectrofotómetro a 590 nm.

En la Fig. 3.1 se muestra el diagrama de flujo de la metodología que se llevó a cabo para la realización de este trabajo.



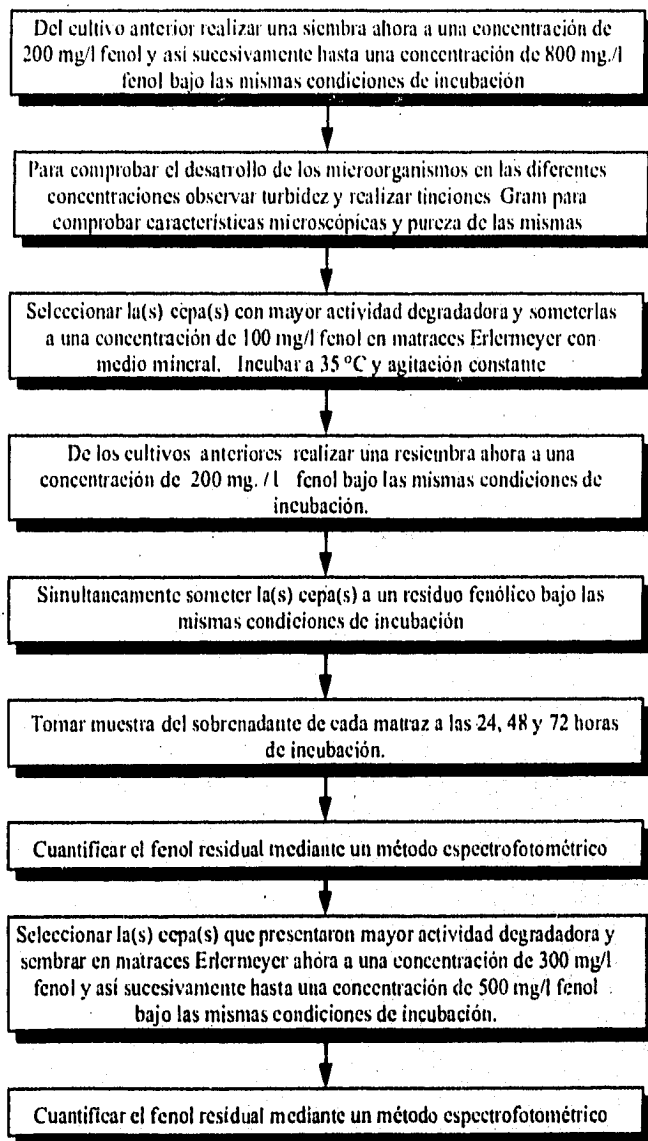


Fig. 3.1 Diagrama de flujo de la metodología realizada.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSION

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Del total de cajas Petri (3 cajas para cada dilución), con medio mineral adicionado con 100 mg/l fenol y agar bacteriológico se inocularon con cada una de las muestras de tierra obtenidas de las compañías elejidas para la realización de este estudio.

El crecimiento de colonias en las cajas Petri se observó a las 24 horas de incubación, en este punto no era posible distinguir aún las características macroscópicas de las colonias que lograron desarrollar.

Sin embargo, a las 48 horas de incubación las características macroscópicas de las colonias permitieron distinguir de manera cualitativa la presencia de bacterias y levaduras. El reconocimiento preliminar de cada colonia que logró desarrollar se complementó con observaciones de preparaciones de frotis teñidas al Gram con la ayuda del microscopio óptico a 100, 400 y 1000 aumentos.

En estos frotis se observaron bacilos cortos Gram negativos (cocobacilos), agrupados en pares y cadenas cortas, bacilos Gram negativos rectos agrupados en cadena; así como levaduras.

Una vez realizado lo anterior, se procedió a resembrar las colonias que fueron aisladas en cajas Petri con medio mineral adicionado con 100 mg/l fenol y agar bacteriológico incubándolas 48 horas a 35°C. Una vez que desarrollaron las colonias y comprobada su pureza, se procedió a la caracterización de cada una de ellas mediante la utilización de pruebas bioquímicas.

Los géneros caracterizados de cada una de las muestras de las compañías involucradas en este estudio se muestran a continuación en la **Tabla 4.1**.

COMPañIA	GENEROS IDENTIFICADOS
I	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
II	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
III	<i>Candida sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Sachharomyces sp.</i>
IV	<i>Alcaligenes sp.</i> <i>Candida sp.</i>
V	<i>Candida sp.</i> <i>Sachharomyces sp.</i>

Tabla 4.1 Géneros identificados en cada una de las muestras evaluadas.

Como se puede observar en la tabla anterior, de las 15 cepas aisladas, el 54% corresponde a bacterias y el 46% a levaduras; sin embargo, el género que se identificó en las cinco muestras de las compañías elegidas para la realización de este trabajo fue el de *Candida sp.*, seguido de *Pseudomonas sp.*, representando en porcentaje el 100% y el 60% respectivamente.

Las cepas caracterizadas se resembraron en tubos de ensaye con medio mineral adicionado con 100 mg/l fenol (3 tubos para cada cepa), y se incubaron 48 horas a 35 °C.

De los cultivos anteriores se realizaron resiembras en medio mineral adicionado con el hidrocarburo ahora a una concentración de 200 mg/l fenol y así sucesivamente hasta una concentración de 800 mg/l fenol bajo las mismas condiciones de incubación.

Durante el desarrollo del trabajo experimental, la muestra IV se perdió (los tubos inoculados se rompieron al caerse de la mesa de trabajo).

Todas las cepas de las muestras I, II, III y V desarrollaron en los tubos de ensaye con medio mineral adicionado con el hidrocarburo a las cuales fueron sometidas hasta la concentración de 500 mg/l fenol a las 24 horas de incubación.

Sin embargo, se determinó que el límite de fenol incorporado al medio mineral fué de 800 mg/l fenol debido a que el desarrollo de las cepas a la concentración de 600 mg/l fenol se presentó a las 72 horas de incubación ; a la concentración de 700 mg/l fenol se presentó a las 120 horas de incubación y por último a la concentración de 800 mg/l fenol se incubaron las cepas 168 horas y ya no se observó desarrollo de las mismas.

Los resultados anteriormente citados se corroboraron mediante la observación del desarrollo en los tubos inoculados, la confirmación de sus características microscópicas y pureza de las mismas.

En la **Tabla 4.2** se muestran las cepas que desarrollaron en el medio mineral adicionado con 600 y 700 mg/l fenol las cuales desarrollaron a las 72 y 120 horas respectivamente.

Muestra	mg/l fenol	Género
I	600	<i>Alcaligenes sp.</i>
I	600	<i>Pseudomonas sp.</i>
II	600	<i>Acinetobacter sp.</i>
II	600	<i>Candida sp.</i>
III	600	<i>Pseudomonas sp.</i>
V	600	<i>Candida sp.</i>
I	700	<i>Pseudomonas sp.</i>
II	700	<i>Acinetobacter sp.</i>
III	700	<i>Alcaligenes sp.</i>
V	700	<i>Candida sp.</i>

Tabla 4.2 Cepas que desarrollaron a una concentración de 600 y 700 mg/l fenol.

De lo anterior se desprende que conforme se va incrementando la concentración de fenol adicionado al medio mineral, el tiempo que tardan en metabolizar las cepas dicho hidrocarburo se acrecienta notablemente

Razón por la cual, las cepas que presentaron mayor actividad degradadora fueron seleccionadas para continuar con este estudio son:

Pseudomonas sp., *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Candida sp.* de las muestras I, II, III y V respectivamente.

En una segunda fase, se procedió al cultivo de las cepas en condiciones de agitación, para ello fueron inoculadas en matraces Erlenmeyer con medio mineral adicionado con fenol e incubadas en una mesa rotatoria a 125 rpm a 35°C.

Bajo estas condiciones fueron tomadas alícuotas para realizar la determinación cualitativa de fenol presente en el medio a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Las concentraciones de fenol que fueron elegidas para esta fase fueron 100 mg/l y 200 mg/l fenol, ya que en ellos se había determinado una velocidad de crecimiento mayor; además, fue utilizado un residuo fenólico obtenido de algunas de las prácticas que se desarrollan en el laboratorio de Fisicoquímica (Lab. 4E, edificio A, Fac. Química) cuya concentración fue de 315 mg/l.

Para efectuar la determinación cuantitativa de fenol degradado y a la par así también determinar en que tiempo de incubación se presenta el óptimo de

degradación del hidrocarburo en estudio; se empleó un método espectrofotométrico descrito en el capítulo anterior.

La determinación del fenol residual a las 24, 48 y 72 horas de incubación permitió determinar el porcentaje del hidrocarburo metabolizado y seleccionar dentro de estas cepas a las que presentan mayor actividad degradadora.

En las **Tablas 4 a**, **4 b** y **4 c** se muestran los resultados obtenidos tras cuantificar el fenol metabolizado por cada una de las cepas que presentaron mayor actividad degradadora a una concentración de 100, 200 y 315 (residuo fenólico) mg/l fenol a las 24, 48 y 72 horas de incubación respectivamente.

Muestra	Genero identificado	t (hrs)	f inicial en mg	f final en mg	% utilizado
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	24	100	2.272	97.728
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	24	100	1.776	98.224
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	24	100	2.479	97.521
V	<i>Candida sp.</i>	24	100	1.239	98.761
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	24	200	2.685	98.657
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	24	200	2.535	98.732
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	24	200	2.535	98.732
V	<i>Candida sp.</i>	24	200	1.735	99.132
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	24	315	94.209	70.092
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	24	315	107.432	65.891
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	24	315	114.043	63.795
V	<i>Candida sp.</i>	24	315	115.696	63.261

Tabla 4 a. Fenol biodegradado a las 24 horas de incubación.

Muestra	Género Identificado	t. (hr)	inicial en mg.	final en mg.	% utilizado
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	48	100	0.826	99.174
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	48	100	1.239	98.761
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	48	100	1.652	98.348
V	<i>Candida sp.</i>	48	100	0.702	99.298
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	48	200	1.489	99.255
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	48	200	1.332	99.334
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	48	200	1.239	99.381
V	<i>Candida sp.</i>	48	200	0.991	99.504
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	48	315	12.809	95.933
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	48	315	63.63	79.799
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	48	315	79.334	74.814
V	<i>Candida sp.</i>	48	315	90.077	71.403

Tabla 4 b. Fenol biodegradado a las 48 horas de incubación.

Muestra	Género Identificado	t. (hr)	inicial en mg.	final en mg.	% utilizado
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	72	100	0.0628	99.937
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	72	100	0.6287	99.371
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	72	100	0.5973	99.402
V	<i>Candida sp.</i>	72	100	0.1311	99.869
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	72	200	0.5031	99.748
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	72	200	1.0891	99.457
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	72	200	0.7515	99.624
V	<i>Candida sp.</i>	72	200	1.5711	99.614
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	72	315	11.3171	96.407
II	<i>Acinetobacter sp.</i>	72	315	52.8151	83.233
III	<i>Alcaligenes sp.</i>	72	315	30.18	90.419
V	<i>Candida sp.</i>	72	315	22.635	92.814

Tabla 4 c. Fenol biodegradado a las 72 horas de incubación.

Al analizar las tres tablas anteriormente expuestas se observa que en la **Tabla 4 a**, todas las cepas tras 24 horas de incubación con una concentración de 100 mg/l fenol presentan un porcentaje de biodegradación superior al 97%, situación que se presenta en forma similar a la concentración de 200 mg/l fenol ya que se presenta un porcentaje de biodegradación superior al 98% y que disminuye significativamente en la concentración de 315 mg/l fenol, ya que se obtuvo un porcentaje de biodegradación superior al 63%; lo que indica en este último caso, que al incrementarse la concentración de fenol, las cepas requieren de mayor tiempo para poder metabolizar al hidrocarburo. Estas observaciones se hicieron en función del género que asimiló en menor porcentaje al hidrocarburo en estudio.

Por lo que respecta a la **Tabla 4 b**, a la concentración de 100 mg/l fenol, el porcentaje de biodegradación es superior al 98%, a la concentración de 200 mg/l fenol es superior al 99% y a la concentración de 315 mg/l fenol es superior al 71%; lo que indica en este último caso que el factor tiempo influye directamente en el porcentaje de degradación del hidrocarburo por parte de las cepas sometidas a tales condiciones, nuevamente tomándose como parámetro al género que biodegradó en menor porcentaje al hidrocarburo en estudio.

En el caso de la **Tabla 4 c**, se observa que para la concentración de 100 y 200 mg/l fenol el porcentaje metabolizado es superior al 99%, no así para el caso del residuo fenólico que fue del 83% para el caso del género que menos fenol biodegradó.

En base a los resultados obtenidos se ponen de manifiesto dos parámetros que influyen directamente en la biodegradación del hidrocarburo; los cuales son el tiempo de incubación y la concentración de fenol a la cual se someten las cepas.

Por último, se eligió al género *Pseudomonas sp.* y *Candida sp.* de las muestras I y V respectivamente, de acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente como las cepas que demostraron mayor actividad degradadora para someterlas ahora a una concentración de 300, 400 y 500 mg/l fenol bajo las mismas condiciones de incubación. Debido a que a ésta última concentración de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera parte de este estudio, el desarrollo de las cepas se presentaba tras 24 horas de incubación, considerándose por tanto esta concentración como el máximo óptimo para que desarrollaran las cepas en ese lapso de tiempo; además de que el porcentaje degradado de fenol como se observa en la **Tabla 4 a** por estos géneros a las 24 horas de incubación, fue superior al 97% y 99% en el caso del género *Pseudomonas sp.* y *Candida sp.* respectivamente.

Razón por la cual se decidió tomar las muestras del sobrenadante de los matraces a las 48 y 72 horas de incubación

Los resultados obtenidos tras cuantificar el fenol residual de estas dos cepas que demostraron mayor actividad degradadora se muestran a continuación en la **Tabla 4.3**.

Muestra	Cepa identificada	t (hr)	Inicial en mg.	Final en mg.	% utilizado
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	48	300	24.08	91.97
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	72	300	17.87	94.08
V	<i>Candida sp.</i>	48	300	91.26	69.58
V	<i>Candida sp.</i>	72	300	21.54	92.81
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	48	400	136.89	65.77
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	72	400	73.51	81.62
V	<i>Candida sp.</i>	48	400	152.11	61.97
V	<i>Candida sp.</i>	72	400	110.27	72.43
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	48	500	197.73	60.45
I	<i>Pseudomonas sp.</i>	72	500	139.42	72.11
V	<i>Candida sp.</i>	48	500	248.43	50.31
V	<i>Candida sp.</i>	72	500	190.12	61.96

Tabla 4.3 Cepas que demostraron mayor actividad degradadora.

Como se puede observar en la tabla anterior, nuevamente los parámetros tiempo y concentración influyen notablemente en cuanto al porcentaje de fenol biodegradado por estas dos cepas; sin embargo, el factor que más influye es la concentración de fenol a la cual se sometieron las mismas, obteniéndose como un máximo de degradación a las 72 horas de incubación un 72.11% y 61.96% del género *Pseudomonas sp.* y *Candida sp.* respectivamente a una concentración de 500 mg/l fenol.

Conclusiones

- Se comprobó experimentalmente la existencia de microflora con capacidad para biodegradar fenol como única fuente de carbono, en las cinco muestras de las compañías involucradas en la realización de este trabajo; debido a selección natural de microorganismos con esta capacidad metabólica, o por, inducción y/o desrepresión de enzimas específicas.

- De las cinco muestras que se tomaron para llevar a cabo el presente trabajo, un total de 15 cepas fueron aisladas y caracterizadas.

- De las 15 cepas aisladas, el 54% correspondió a bacterias y el 46% a levaduras, por lo que este último grupo demuestra una contribución muy importante en cuanto a la biodegradación del fenol.

-El género *Candida sp.* se aisló en el 100% de las muestras evaluadas, seguido del género *Pseudomonas sp.* que representó un 60%.

- La industria de la cual se logró aislar el 33.0% de las cepas capaces de biodegradar al hidrocarburo en estudio fue la compañía I, fabricante de resinas.

- Sólo el 13% de las cepas aisladas lograron desarrollar a una concentración de 700 mg/l fenol, obteniéndose un porcentaje de biodegradación superior al 61% tras 72 horas de incubación.

- Se encontró que la concentración máxima de fenol óptima para que desarrollaran las cepas fue de 500 mg/l fenol en 24 horas de incubación.

- De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se desprende la posibilidad de aprovechar el hecho de que gran número de microorganismos son capaces de biodegradar gran variedad de compuestos tóxicos producidos durante los procesos industriales, representando esta una alternativa en el tratamiento de residuos industriales. Para ello se requirieran establecer las condiciones óptimas para el desarrollo de los microorganismos y de la degradación del fenol.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexander, M. 1978. Introducción a la microbiología del suelo. Ed. AGT. S.A. México. p. 231-239.
- 2.- Allsop, P.J., M.M. Young., and G.R. Sullivan. 1993. Dynamics of phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 572-580.
- 3.- Atlas, R.M. 1978. Microorganism and petroleum pollutants. *Bioscience.* **28**: 387-391.
- 4.- Balows, A. et al. 1991. Manual of clinical microbiology. Fifth edition, American Society for microbiology. Washigton D.C. p. 410-426.
- 5.- Beltrame, P., L.P. Beltrame, P. Carniti, D. Guardione, and C. Lanzetta. 1988. Inhibiting action of chlorophenols on biodegradation of phenol and its correlation with structural properties of inhibitors. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 821-828.
- 6.- Berezkinz, N.E., S.P. Grigorieva., E.A. Andreevskaya., O.N. Rudchenko., and A.A. Lushnikov. 1992. Selection of microorganisms degrading phenol and methanol. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **28**: 565-570.
- 7.- *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology.* 1984. Baltimore, USA. Ed. Williams and Wilkins. Co.
- 8.- Boyd, S.A., and D.R. Shelton. 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenol in fresh and acclimated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 272-277.
- 9.- Brock, D.T., and T.N. Madigan. 1991. *Biology of microorganisms.* Sixth Edition Prentice Hall. USA. p. 480-485.
- 10.- Burton, N.F., M.J. Day, and A.T. Bull. 1982. Distribution of bacterial plasmid in clean and polluted sites in a south wales river. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1021-1029.
- 11.- Cerniglia, C.E., D.T. Gibson, and C. Van Baalen. 1980. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *J. Gen. Microbiol.* **116**: 495-500.
- 12.- Chakravarty, M., P.M. Amin, H.D. Singh, J.N. Baruah, and M.S. Iyengar. 1972. A kinetic model for microbial growth on solid hydrocarbons. *Biotechnol. Bioeng.* **14**: 61-73.

- 13.- Choteau, J., E. Azoulay, and J.C. Senez. 1962. Anaerobic formation of n-hept-1-ene from n-heptane by resting cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature*. **194**: 576-578.
- 14.- Dagley, S. 1978. Pathway for the utilization of organic growth substrates. *The Bacteria*. **6**: 305-388.
- 15.- Dapaah, S.Y., and G.A. Hill. 1992. Biodegradation of chlorophenol mixtures by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1353-1358.
- 16.- Edwards, H.V. 1970. The influence of high substrate concentrations of microbial kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 679-712.
- 17.- Frobisher, C.A., and R. Fuerst. 1974. *Microbiología*. Ed. Interamericana. México. p. 192-199.
- 18.- Gibson, D.T. 1968. Microbial degradation of aromatic compounds. *Science*. **161**: 1093-1097.
- 19.- Goodman y Gilman. 1991. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Octava edición. Editorial Médica Panamericana. México. p. 887.
- 20.- Harayama, S., and R.H. Don. 1985. Catabolic plasmids their analysis and utilization in the manipulation of bacterial metabolic activities. *Gen. Eng.* **8**: 283-307.
- 21.- Harayama, S., N. Mermood, M. Reik, P.R. Lehrbach, and K.N. Timmis. 1987. Roles of the divergent branches of the meta-clavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates. *J. Bacteriol.* **169**: 558-564.
- 22.- Helinski, D.R. 1985. *Plasmids in bacteria (Basic life sciences)*. Plenum Press. N.Y. p. 719-739.
- 23.- Heredia, A. 1991. *Utilización de compuestos aromáticos por la industria*. Supl. Química de refinación. PEMEX.
- 24.- Hopwood, D.A. 1989. *Genetics of bacterial diversity*. Academic press. England London. p. 151-174.
- 25.- 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.
- 26.- Leahy, J.G., and R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial. Rev.* **54**: 303-315.

- 27.- Marr, E.K., and R.W. Stone. 1961. Bacterial oxidation of benzene. *J. Bacteriol.* **81**: 425-428.
- 28.- Molina, H. 1963. Química general y aplicada a la industria. Tomo II. Segunda edición. Ed. Gustavo Gili. Barcelona. p. 53-74.
- 29.- Morrison, R.T., and R.N. Boyd. 1987. Química Orgánica. Segunda Edición. Addison-Wesley Iberoamericana. México. p. 952-955.
- 30.- Pawlowsky, V., and J.A. Howell. 1973. Mixed culture biooxidation of phenol. *Biotechnol. Bioeng.* **15**: 889-896.
- 31.- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan, N.R. Krieg, and D.N. Edwards. 1993. Microbiology concepts and applications. Ed. McGraw-Hill. USA. p. 222-235.
- 32.- Rakoff, H. 1974. Química orgánica fundamental. Ed. Limusa. México. p. 602-611.
- 33.- Reine, K. W., and H.J. Knackmuss. 1980. Hybrid pathway for chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas sp.* b13 derivatives. *J. Bacteriological.* **142**: 467-473.
- 34.- Rozich, A.F., and J.R. Colvin. 1986. Effects of glucose on phenol biodegradation by heterogeneous populations. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 965-981.
- 35.- Schaeffer, T.L., S.G. Catwell., J.L. Brown., D.J. Watt., and R.R. Fall. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: Terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 742-746.
- 36.- Shields, S.M., S.W. Hooper, and G.R. Saylor. 1986. Plasmid mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl. *J. Bacteriol.* **163**: 882-889.
- 37.- Sokol, W. 1987. Oxidation of an inhibitory substrate by washed cell (oxidation of phenol by *Pseudomonas putida*). *Biotechnol. Bioeng.* **30**: 921-927.
- 38.- Sokol, W. 1988. Uptake rate of phenol by *Pseudomonas putida* grown in unsteady state. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 1097-1103.
- 39.- Sokol, W., and A. Howell. 1981. Kinetics of phenol oxidation by washed cell. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2039-2049.
- 40.- Song, H.G., and R. Bartha. 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 646-651.

- 41.- Spain, J. C., and P.A. van Veld. 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 428-435.
- 42.- Spain, J.C., P.H. Pitchard., and A.W. Bourgen. 1980. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 726-734.
- 43.- Standard Methods. 18 th. Edition. 1992. For the examination of water and wastewater. USA. p. 5-30-5-33.
- 44.- Wingrove, S.A. 1984. *Química orgánica*. Ed. haria. México. p. 810-811.
- 45.- Yamada, K., J. Takahashi, and K. Kobayashi. 1963. Utilization of hydrocarbons by microorganisms. *Nature*. p. 1115.
- 46.- Yang, R. D., and E.A. Humphrey. 1975. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 1211-1235.
- 47.- Young, J.L., K. Hya, and H.S. Kim. 1995. Amplification of toluene dioxygenase genes in a hybrid *Pseudomonas* strain to enhance the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene mixture. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 488-494.
- 48.- Zobell, C.E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological reviews.* **10**: 1-49.