

ASPECTOS ECOLOGICOS Y BIOQUIMICOS DE LA DEGRADACION MICROBIANA DE XENOBIOTICOS (1)

Por: L. A. Golovleva (2)

G. K. Skriabin (2)

Traduc. del ruso por Guillermo A. Flórez Ochoa (3)

RESUMEN

Con base en el análisis de los datos bibliográficos y en el de los propios autores, se establecen los principios de una adecuada utilización de los microorganismos en la degradación de compuestos que contaminan la biosfera.

Se consideran las perspectivas de la posible utilización de los microorganismos tanto para métodos extensivos como para intensivos, de limpieza del medio ambiente. En el artículo se considera el empleo de microorganismos especialmente seleccionados para la utilización de xenobióticos (poluentes, sustancias extrañas a la biosfera) en calidad de sustratos de crecimiento; el incremento de la capacidad de la microflora natural del suelo y del agua para metabolizar los xenobióticos; como también la acción cooperativa de los microorganismos sobre compuestos extraños.

Se llega a la conclusión de que las investigaciones contemporáneas sobre la degradación microbiana de xenobióticos, adolecen de una base firme de investigaciones ecológicas y ecologo-bioquímicas.

La investigación de la degradación microbiana de compuestos extraños (xenobióticos) presenta gran interés desde diversos puntos de vista.

Es importante conocer la suerte que corren las sustancias extrañas en la biosfera y evaluar el papel que juegan los microorganismos en su transformación. Desde este punto de vista, nos interesan las causas de la acumulación de los compuestos extraños y sus intermediarios en la biosfera; las diversas direcciones que toma la transformación microbiana de los xenobióticos; la intervención de los diferentes grupos de microorganismos, así como también las condiciones en que ocurren estos procesos.

Otro aspecto importante de este problema, íntimamente relacionado con la bioquímica de los organismos superiores y la medicina, es la interacción de la célula viva, en este caso la del microbio, con las sustancias extrañas; la naturaleza de los complejos de fermentos que intervienen en la transformación de estos compuestos; las leyes que regulan el primer ataque sobre los sustratos de diferente tipo; los distintos tratamientos enzimáticos que reciben los productos del primer ataque, antes de ser sometidos al metabolismo central, como también las características de la regulación de estos procesos.

Un lugar especial en este problema, ocupa la influencia de los compuestos extraños en las poblaciones naturales microbianas.

(1) Tomado de "Izvestia". Academia de Ciencias de la URSS. Moscú. Serie-Biología No. 3, 1976.

(2) Instituto de Bioquímica y Fisiología de Microorganismos, Academia de Ciencias de la URSS, Pushino.

(3) Profesor Depto. de Biología. Universidad de Antioquia.

Las investigaciones en diversas direcciones proliferaron en muchos laboratorios, tanto en la URSS como en el extranjero. Estas investigaciones se intensificaron al ser estimuladas por las perspectivas de la posible utilización práctica de la microflora, en la destoxificación de compuestos estables arrojados a la biosfera. En la actualidad se valoran altamente las posibilidades del empleo de métodos microbiológicos.

El análisis de la situación actual respecto a este problema conduce a la siguiente conclusión: hace falta correspondencia entre los tipos y métodos de investigación y la posible tecnología en la utilización de los métodos microbiológicos de destrucción de xenobióticos.

En la mayoría de los casos, los investigadores se mueven por los caminos tradicionales del estudio, a nivel de laboratorio, de los procesos microbiológicos, utilizando el enfoque y los métodos que surgieron principalmente de la microbiología general y técnica. La atención se concentra básicamente en la separación de microorganismos capaces de utilizar los xenobióticos como fuente única de carbono y en la intensificación de estos procesos. Para el efecto, se utilizan las condiciones tradicionales de: cultivos puros, alta aireación, temperaturas óptimas y cepas caracterizadas por su gran intensidad de acción sobre los xenobióticos en estas condiciones.

Al estudiar la descomposición microbiológica de los xenobióticos, es indispensable considerar tanto los métodos intensivos, como los extensivos. Los métodos intensivos, están ligados a obras especiales de limpieza y deben jugar el papel principal en la purificación de aguas de desecho de la industria y en algunos casos de otras aguas como por ejemplo las de los arrozales.

La neutralización de xenobióticos directamente en la biosfera, se puede lograr solamente por métodos extensivos que permitan una acción directa sobre estos compuestos en grandes superficies del suelo o de depósitos naturales de agua.

Estos métodos hasta el momento han sido deficientes, pero su desarrollo se ha convertido en premisa indispensable para resolver el problema de la limpieza de la biosfera.

Por eso, es necesario considerar la utilización de los microorganismos en la degradación de compuestos extraños desde dos posiciones, según que el método a utilizar sea intensivo o extensivo.

I. USO DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS, ESPECIALMENTE ESCOGIDOS, QUE UTILIZAN LOS XENOBOTICOS EN CALIDAD DE MEDIOS DE CRECIMIENTO

Las investigaciones modernas acerca de la acción microbiana sobre compuestos extraños a la biosfera, están orientadas principalmente hacia la búsqueda, re-

colección y selección de cepas de microorganismos capaces de utilizar estos compuestos en calidad de fuentes de alimento.

Los microorganismos capaces de crecer a expensas de los xenobióticos, pueden ser separados (aislados) de la naturaleza, con mayor o menor facilidad, según el caso. Respecto a esto, la naturaleza del sustrato juega un papel decisivo.

Con mucha frecuencia se encuentran especímenes en la naturaleza, capaces de metabolizar sustancias, tales como los n-alcenos y, menos frecuentemente, cultivos que descomponen los hidrocarburos aromáticos. Hasta ahora, prácticamente no se ha logrado la separación de microorganismos capaces de crecer en DDT, difenil-pentaclóricos u otros compuestos policlorados.

En algunos trabajos se describen cultivos de diferentes grupos taxonómicos, los cuales se desarrollan a base de sustancias de la más variada estructura química. Los investigadores trataron de introducir en la biosfera, cultivos activos de tales microorganismos obtenidos en condiciones de laboratorio.

a) Experimentos Sobre la Introducción de Cultivos en la Biosfera.

Los resultados de la introducción en la biosfera de cultivos obtenidos en el laboratorio fueron diversos. En California (EE.UU), se llevó a cabo la introducción artificial de microorganismos capaces de asimilar hidrocarburos en el lugar de ruptura de un oleoducto, donde gran cantidad de combustible se derramó sobre la arena. En este caso el experimento dio resultados altamente positivos, al lograrse la desintegración completa de la gasolina derramada.

Así mismo, en EE.UU. se utilizan biomasa de microflora activa para la descomposición de hidrocarburos; sin embargo, es necesario anotar que la sola biomasa de microorganismos es insuficiente, y por lo tanto, se debe agregar fuentes de nitrógeno y fósforo.

El anterior es un ejemplo de uno de los pocos casos, en que se ha utilizado exitosamente la introducción de cultivos puros en la biosfera, con el fin de degradar compuestos extraños. Cabe precisar que los sustratos utilizados en los ejemplos arriba citados-hidrocarburos de petróleo-son de relativamente alta degradabilidad. En los experimentos de Anderson (Anderson et al., 1970, 1971, 1972), no dieron resultados positivos los intentos de utilizar microorganismos capaces de descomponer insecticidas para su neutralización en el suelo.

En el laboratorio se logró degradar DDT hasta metabolitos solubles en agua con la ayuda del hongo *Mucor alternans*, pero la introducción de esporas en tierra infectada con DDT, no produjo el resultado esperado. Los experimentos realizados con C¹⁴ - DDT mostraron que: la presencia de otros hongos en el suelo, los metabolitos de éstos, los residuos de otros insecticidas, etc., en condiciones de campo, influyen poderosamente en la descomposición realizada por cultivos de *Mucor alternans*.

En nuestros experimentos de introducción artificial de microorganismos que degradan ORDRAM, en depósitos naturales de agua contaminados con éste, aquellos fueron rápidamente desplazados por representantes de la microflora natural.

Según los datos de D.G.Zviagintsev (1957), la introducción artificial de microorganismos en un ecosistema, puede ser efectiva utilizando una tonelada de células microbianas por hectárea, sin embargo, para asegurar una adaptación exitosa, es conveniente y necesario suministrar fuentes adicionales de carbono.

Los datos disponibles, permiten deducir que es más factible la utilización de microorganismos seleccionados en el laboratorio, en procesos tecnológicos intensivos, aplicados en la limpieza de aguas negras industriales o de aguas sucias de los sembrados de arroz.

Existe, sin embargo, toda una serie de problemas que requieren solución: 1) la elaboración y perfeccionamiento de métodos que eleven considerablemente la actividad de los cultivos aislados del medio natural y 2) el problema de su estabilidad, al formar parte del limo activo. De mayor perspectiva parece ser la fijación de estos organismos en una fase sólida y la utilización de biofiltros.

Respecto a los métodos extensivos de limpieza, basados en la introducción a la biosfera de microorganismos, se puede afirmar que éstos continúan siendo un problema de difícil solución.

La experiencia que se tiene testifica que, en situaciones apremiantes, cuando se hace necesario limpiar el suelo o el material parental de una acumulación considerable de compuestos extraños, en un territorio pequeño, la utilización de microorganismos está justificada completamente, máxime si se trata de sustratos fácilmente degradables. Está aún remota la posibilidad de introducir cultivos de microorganismos en extensos territorios para una acción prolongada en el medio natural.

b) Aspectos Ecológicos de la Introducción de Cultivos en la Biosfera.

Al intentar la introducción artificial de microorganismos en el suelo o en el agua, surge una serie de problemas ecologo-bioquímicos prácticamente no tratados hasta ahora.

Frecuentemente, en experimentos de laboratorio, los microorganismos activos utilizados para la descomposición de xenobióticos son cultivos de *Pseudomonas*.

Así mismo, de acuerdo a nuestros datos en las tierras cultivadas de Podmoscovia (nosotros estudiamos la acción del herbicida Alvison sobre la microflora natural de estas tierras), la microflora predominante, sin embargo, no estaba representada por *Pseudomonas*. (Tabla 1) (Golóvleva y otros, 1976).

Las *Pseudomonas* aparecen solamente a mitad de la estación y su número es relativamente pequeño. Resultados semejantes obtuvimos al analizar la composición de la microflora presente en aguas desechadas de arrozales.

Al investigar las posibilidades de utilizar microorganismos para purificar el medio ambiente de xenobióticos, es necesario tener en cuenta en cada caso las condiciones reales existentes en la naturaleza. A continuación ilustraremos la posibilidad de llevar a cabo lo concebido con dos ejemplos:

TABLA No. 1

INFLUENCIA DEL HERBICIDA ALVISON-8 EN LA DINAMICA DE LA COMPOSICION CUALITATIVA DE LA MICROFLORA DE UN PODZOL SEMBRADO DE ZANAHORIAS.							
GRUPOS TAXONOMICOS DE MICRO-ORGANISMOS	Antes del Tratamiento (5-V)	5 días después del tratamiento (28 - V)		10 días después del tratamiento		20 días después del tratamiento	
		Testigo	ALVISON	Testigo	ALVISON	Testigo	ALVISON
Arthrobacter spp.	6,6	11,8	8,0	1,8	1,0	3,3	3,1
Bacillus spp.	9,6	5,5	7,0	1,2	5,0	0,4	0,1
Nocardia coeliaca	2,2	0,8	4,4	0,5	3,4	0,2	0,1
Actinomycetes spp.	2,9	3,0	1,7	1,2	3,4	0,7	0,4
Pseudomonas spp.	—	—	—	—	—	0,3	0,1
Mycococcus spp.	—	—	—	—	—	0,2	—
Nocardia rhodochrous (Mycobacterium brevicale)	—	—	—	—	—	0,9	0,6

Nota:

Se analizaron todas las colonias de microorganismos crecidas luego de sembrar la cuarta dilución de las muestras en MPA. El tratamiento con ALVISON se realizó el 23 de mayo.

Se estudió la dinámica, efectividad y acción del herbicida ALVISON-8 sobre la microflora. Se descubrió que el herbicida se acumula en la capa superior y no migra a capas más profundas siendo así accesible a la microflora natural del suelo. (Tabla 2) (Golovleva y otros; 1975).

TABLA 2

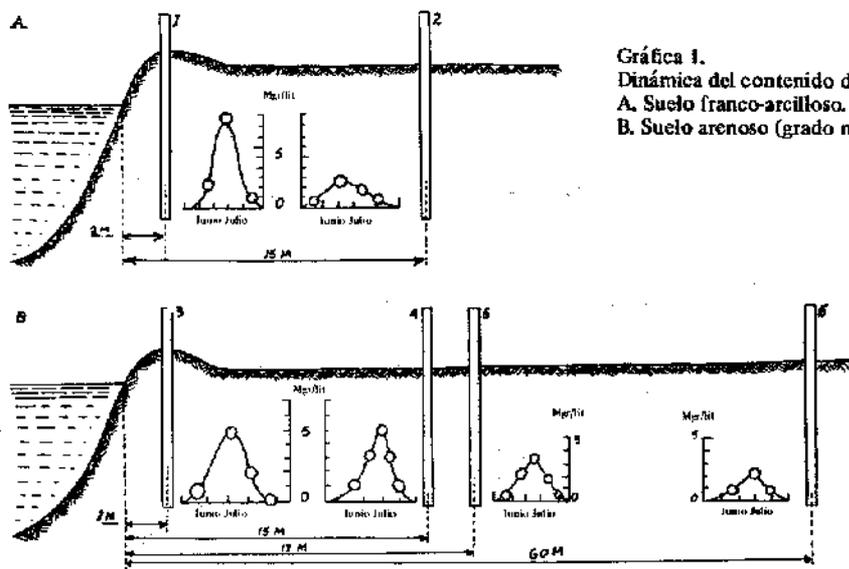
CONTENIDO DE ALVISON EN EL SUELO			
Plazos en la toma de muestras, Días	CANTIDAD DE ALVISON, mgr / kgr.		
	1a. capa 0-2,5 cm.	2a. capa 2,5-5.0 cm.	TOTAL
0	19,9-22,4	0	19,9-22,4
4	13,9-15,1	1,2-1,4	15,1-16,5
11	9,0-10,3	1,0-1,7	10,0-12,0
17	4,0- 4,6	0,1-0,2	4,1-4 ,8
29	1,1- 1,2	0	1,1- 1,2
63	0	0	0

Los colaboradores del Instituto de Agroquímica y Agrología de la Academia de Ciencias de la URSS, Strekozob B. P. y Chubenko A. P. (1976), con base en resultados de muchos años de investigación acerca del comportamiento del herbicida ORDRAM en el sistema de riego de una plantación de arroz (región de Krasnodar), afirman que los residuos de este pueden llegar hasta las aguas subterráneas que se encuentren a una profundidad de 1 a 2 metros y que estos se propagan a distancias considerables del sistema abierto de regadío, a lo largo del colector principal, en el sentido de la inclinación natural del lugar.

El desplazamiento del tóxico en el agua, a través de las paredes del colector, varía debido a las diferentes estructuras que presentan los perfiles del suelo. De aquí, que la concentración de este en el agua sea diferente en lugares igualmente alejados del colector (Gráfica No. 1).

Obviamente, el enfoque práctico en la utilización de microorganismos con el objeto de degradar herbicidas, debe ser distinto en cada uno de los casos mencionados.

Al introducir artificialmente microorganismos en un ecosistema, es necesario tener en cuenta los factores



Gráfica 1.
Dinámica del contenido de Ordram en el suelo.
A. Suelo franco-arcilloso.
B. Suelo arenoso (grado medio); 1-6. perforaciones.

físico-químicos (PH, el potencial de oxidación-reducción, las variaciones de temperatura, las condiciones de aireación) y biológicos (influencia de la microflora natural, etc.).

II. AUMENTO DE LA CAPACIDAD DE LA MICROFLORA NATURAL TERRESTRE Y ACUÁTICA PARA DEGRADAR LOS XENOBIÓTICOS

Los ensayos para estimular la microflora natural terrestre y acuática en la degradación de xenobióticos, constituyen una de las posibles formas de utilizar los microorganismos. Al parecer, es preferible utilizar esta forma como método extensivo para limpiar extensos territorios de residuos de pesticidas.

La estimulación de la microflora natural se logra por distintos métodos:

- Introduciendo fuentes complementarias de Nitrógeno y fósforo.
- Introduciendo fuentes de carbono que estimulen la disociación microbiana de los xenobióticos.

El primer método se probó al romperse el oleoducto en Pensilvania y derramar 200.000 galones de gasolina los cuales penetraron en calizas porosas pasando luego por medio de las aguas subterráneas, a un nacimiento de agua de donde se abastecía la población.

El Instituto Americano de Petróleo utilizó el bombeo de soluciones salinas (fuentes de nitrógeno y fósforo) en la subcapa caliza. Después continuaron con aire.

Durante quince meses se mantuvieron las condiciones para la fermentación de los residuos del gas-oil en un área de 40 metros cuadrados. La concentración de microorganismos en estas condiciones llegó a 2 billones de células por mililitro de agua subterránea. Esta población estaba representada principalmente por microorganismos de los géneros *Arthrobacter* y *Pseudomonas*.

El segundo método, utilizando el metabolismo, se probó tanto en la URSS como en el extranjero.

En los experimentos realizados en los Estados Unidos (Bernarde et al; 1965), al introducir artificialmente glucosa en un pozo natural de agua contaminada por alquilbencilsulfonatos, aumentó aceleradamente la actividad de la microflora natural del pozo y la descomposición del tóxico fue más rápida en comparación con el sector no tratado con glucosa.

En los experimentos con glucosa, el tóxico fue descompuesto totalmente a los veinte días, en tanto, en el testigo el proceso tardó cuarenta días y fue solo del 90o/o. Es necesario subrayar, que el autor no logró separar de este sistema cultivos capaces de utilizar el alquilbencilsulfonato en calidad de fuente única de carbono.

Resultados parecidos obtuvo Horvath (EE.UU.) con ácido 2,3,6, triclorobencénico (2,3,6 ATB). La disociación de este herbicida, en los experimentos de Horvath, se logró solo en un 35o/o en 18 días, en depósitos naturales de agua. Con la introducción de benzoato aumentó tanto la velocidad de disociación (35o/o en 4 días), como la cantidad total disociada (80o/o en 14 días) (Horvath, 1972).

Utilizando el método del cometabolismo, nos fue posible transformar un sinnúmero de compuestos que, en condiciones normales, no cambian por acción de los microorganismos. (Tabla 3).

El método del cometabolismo fue exitosamente utilizado por nosotros en la degradación total en el laboratorio, de una serie de herbicidas tales como los ácidos fenoxiacéticos, el Alvison-8, el Ordram, etc..

Adicionando como complemento una fuente de carbono al agua de depósitos naturales, se observó una notoria influencia en la velocidad de descomposición del 2,4-D (ácido 2, 4 diclorofenoxiacético). Al agregar propionato, esta descomposición del 2,4-D ocurrió mucho más rápido, que cuando se agregó el cosubstrato. (Gráfica 3).

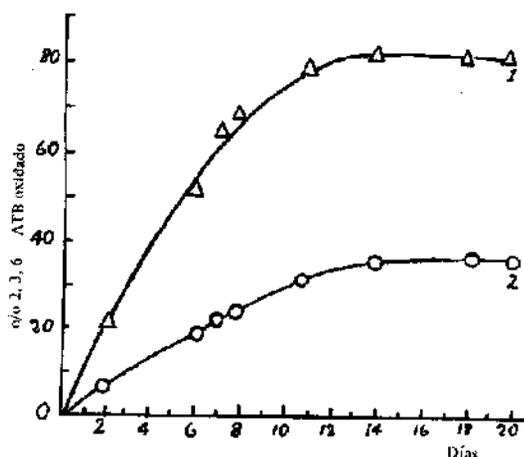
A pesar de que no estamos en condiciones de proponer una tecnología que conlleve a movilizar la microflora natural para la degradación de xenobióticos, no obstante, la experiencia acumulada indica que el principio del cometabolismo, tendiente a activar la microflora natural, tiene grandes perspectivas. Desde el punto de vista económico, es difícil predecir qué es más provechoso para la solución práctica del problema, si la introducción de microorganismos separados en el laboratorio o los cosubstratos para la activación de la microflora natural. A nuestro juicio, el segundo método es superior, tanto desde el punto de vista de los resultados esperados, como desde el punto de vista de las posibles consecuencias para el ecosistema.

Por ahora dichas investigaciones apenas empiezan. Su desarrollo ulterior, obviamente, estará relacionado con la búsqueda de cosubstratos baratos y asequibles.

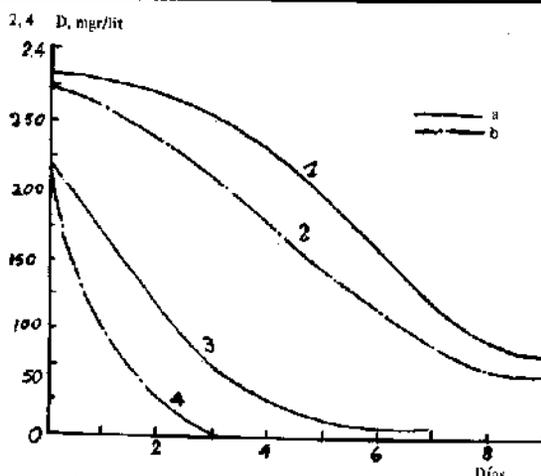
TABLA 3

PRINCIPALES TIPOS DE PROCESOS REALIZADOS POR MICROORGANISMOS EN CONDICIONES DE COMETABOLISMO.

Microorganismos	Substrato de crecimiento	Substrato a transformar	Productos de la Transformación
Nocardia sp. 1A	Glucosa, n-alcanos y otros.	3-metil piridina	Acido nicotínico
Nocardia sp. 1A	n-hexadecano	n-xilol (paraxileno).	Acido tareftálico.
Nocardia sp. 1A	Glucosa hexadecano	n-toluidina (paratoluidina)	Paraacetotoluidina.
Penicillium sp. Rhizopus sp.	Sacarosa	Brevicarin	Brevicolin



Gráfica 2. Cometabolismo del ácido 2,3,6-Triclorobencénico (ATB) 1. en presencia de Benzoato de sodio; 2. sin Benzoato.



Gráfica 3. Dinámica del contenido de 2,4-D en el agua: a. sin cosubstrato, b. con cosubstrato; 1,2. afluente del Río Poltavsky; 3,4. esteros Priazovsky.

III. ACCION COOPERATIVA DE LOS MICROORGANISMOS

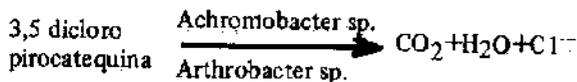
Muchos xenobióticos que se acumulan o son introducidos en la biosfera, son desintegrados por la microflora de los sustratos naturales con mayor o menor rapidez. Al mismo tiempo, la separación de cepas de microorganismos del medio natural, capaces de crecer a expensas de estas sustancias, presenta frecuentemente grandes dificultades.

Se han descrito varios experimentos en los cuales no fue posible a los autores aislar cultivos puros de microorganismos, del agua o del suelo, capaces de disociar los xenobióticos, posiblemente porque la disociación de éstos era el resultado de una acción cooperativa de microorganismos.

Actualmente existe una gran cantidad de datos que muestran, a ciencia cierta, que la unidad más efectiva y funcional en la naturaleza es un conjunto de cultivos, de los cuales unos transforman-parcialmente- y otros continúan el proceso de degradación de los productos de dicha transformación. Estos conjuntos son más estables y viables que los cultivos puros. En los limos activos *trabajan* básicamente mezclas de cultivos.

La utilización de un complejo de cultivos permitió disociar una serie numerosa de pesticidas, tenidos como estables. Así, por ejemplo, utilizando el comensalismo de los cultivos *Brevibacterium sp.* y *Achromobacter sp.*, Horbath desintegró el 2,3,6-triclorobenzoato, uno de los herbicidas más estables (Horvath, 1972).

Acido 2,3,6-triclorobenzoico *Brevibacterium sp.* 3,5 dicloropirocatequina



La disociación de pentaclorofenol, 1,1 -difenetileno y de mezclas de clorodifeniles, se logró efectuar exitosamente utilizando un complejo de cultivos.

Wedemeyer (EE.UU.), demostró la separación de la fracción triclorometilica de la molécula de DDT, por

medio de una serie de reacciones realizadas por un cultivo de *Aerobacter aerogenes* (Wedemeyer, 1967a, b).

Más tarde, Focht y Alexander mostraron que el p,p-dicloro difenilmetano (DDM), proveniente del proceso de degradación del DDT, puede convertirse en ácido n-clorofenilacético.

Sin embargo, el cultivo de *Hydrogenomonas* es incapaz de deshalogenar los productos de la descomposición. El producto clorado proveniente del DDM, fue posible descomponerlo hasta H₂O, CO₂ y HCl pero con la ayuda de hongos (Focht, 1972). Los autores consideran que la utilización de mezclas de cultivos, junto con el suministro de una fuente exógena de carbono, permitiría descomponer cualquier compuesto estable y que estos enfoques aventajan la utilización de cultivos puros, ya que las condiciones se asemejan al máximo a las naturales.

La acción cooperativa de los microorganismos no puede ser fundamentada solamente en los vínculos nutricionales, consistentes en que un cultivo utiliza en su alimentación, los productos del metabolismo de otros cultivos. Las relaciones al interior de la mezcla de microorganismos, pueden ser mucho más complejas.

Al resumir los materiales y consideraciones arriba expuestos, es necesario confirmar que la deficiencia fundamental de las investigaciones modernas, sobre la degradación microbiológica de xenobióticos, es una débil base de investigaciones ecológicas y ecologobioquímicas.

La causa de ello es la apreciación incompleta de las dificultades y problemas que surgen inevitablemente, siendo un obstáculo para los investigadores en sus intentos de utilizar en la práctica los microorganismos que degradan los xenobióticos.

Frente a todo esto, surge la necesidad de resolver una serie de problemas relacionados con la introducción de microorganismos extraños en la biosfera; con el funcionamiento de complejos de microorganismos regulables en condiciones naturales y, con el desarrollo de métodos prácticos para intensificar determinadas funciones de la microflora de sustratos naturales de la biosfera.