

BIORREMEDIACION

“Proceso que utiliza organismos vivos (generalmente microorganismos) para degradar o transformar compuestos tóxicos en menos tóxicos o inocuos”.

Contaminantes biorremediables

Hidrocarburos lineales y halogenados

Hidrocarburos mono aromáticos
(benzeno, Tolueno, Etil benzeno)

Hidrocarburos policíclicos
(Naftaleno, pireno, bezopireno)

Bifenilos policlorados

Pesticidas (DTT)

Explosivos (TNT)

Nitrocompuestos poliméricos
(celulosa, lignina)

Colorantes

Fármacos (antibióticos)

Metales pesados: Cd, Pb, As

Biotransformación:
Conversión a compuestos
menos tóxicos (o mas tóxicos)

Mineralización:
Conversion a H₂O, CO₂ (aeróbica),
CH₄ (anaeróbica)

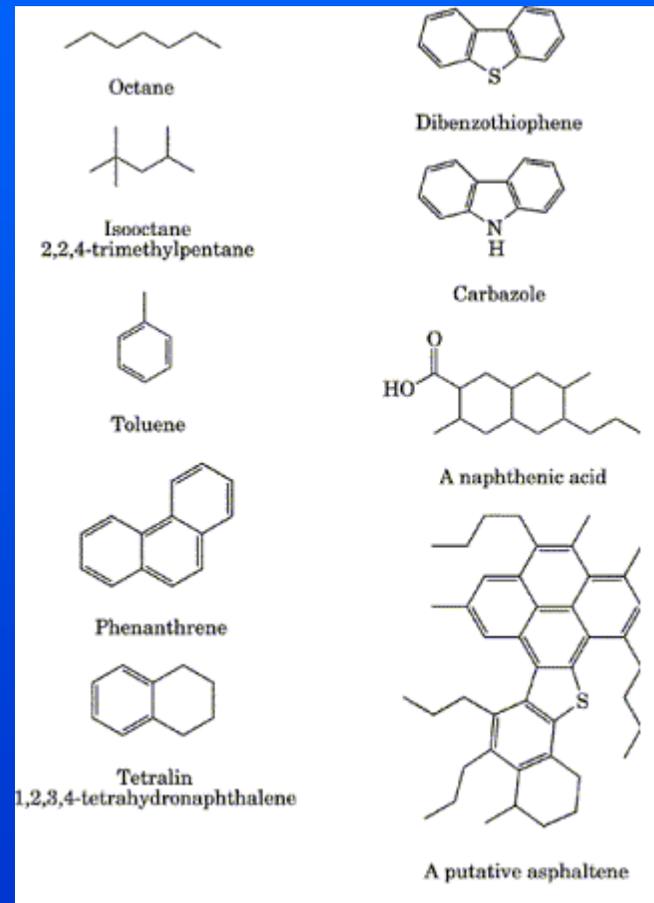
Contaminantes potencialmente biodegradables

Table 1 Some contaminants potentially suitable for bioremediation.

Class of contaminants	Specific examples	Aerobic	Anaerobic	More potential sources
Chlorinated solvents	Trichloroethylene Perchloroethylene		+	Drycleaners Chemical manufacture
Polychlorinated biphenyls	4-Chlorobiphenyl 4,4-Dichlorobiphenyl		+	Electrical manufacturing Power station Railway yards
Chlorinated phenol	Pentachlorophenol		+	Timber treatment Landfills
"BTEX"	Benzene Toluene Ethylbenzene Xylene	+	+	Oil production and storage Gas work sites Airports Paint manufacture Port facilities Railway yards Chemical manufacture
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	Naphthalene Anthracene Fluorene Pyrene Benzo(a)pyrene	+		Oil production and storage Gas work sites Coke plants Engine works Landfills Tar production and storage Boiler ash dump sites Power stations
Pesticides	Atrazine Carbaryl Carbofuran Coumpos Diazinon Glycophosphate Parathion Propham 2,4-D	+	+	Agriculture Timber treatment plants Pesticide manufacture Recreational areas Landfills

Hidrocarburos

Presentes en combustibles y petróleo
Tamaño uno-cientos átomos de carbono.



Algunos hidrocarburos del petróleo

Hidrocarburos aromáticos monocíclicos

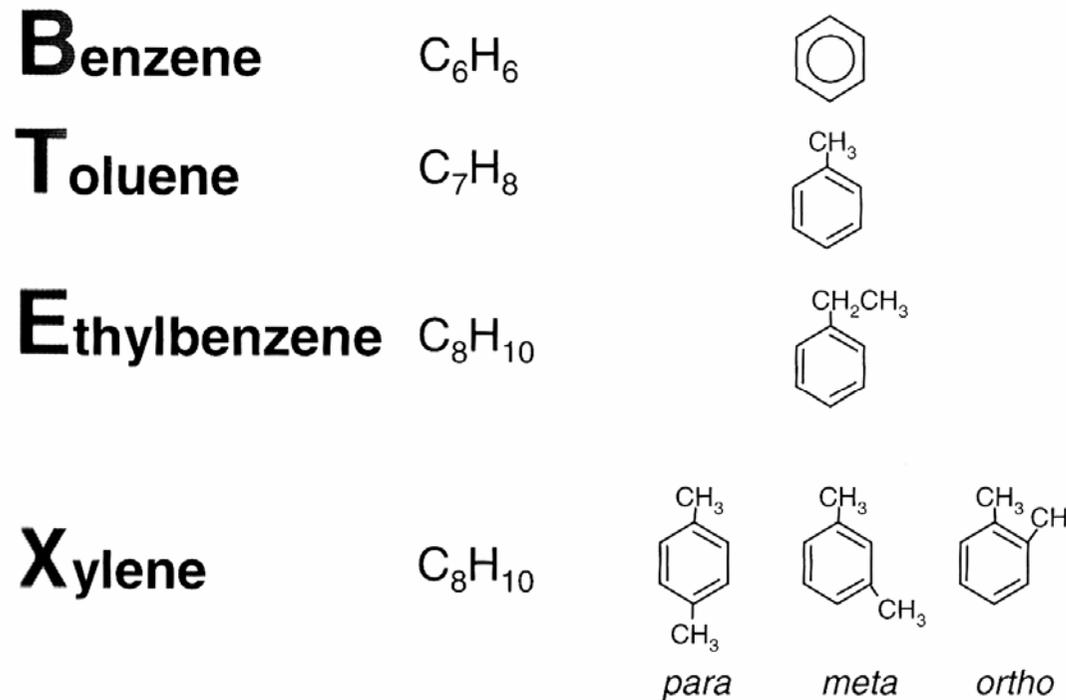


Fig. 1. Molecular formula and structure of the respective BTEX components

Comunes en gasolinas y petróleo

Altamente volátiles utilizados como solventes en diversos procesos industriales

Cancerígenos, hepatotóxicos.

Hidrocarburos aromáticos Policíclicos (PAHs)

Productos de la combustión incompleta de material orgánico, muchos de ellos son cancerígenos

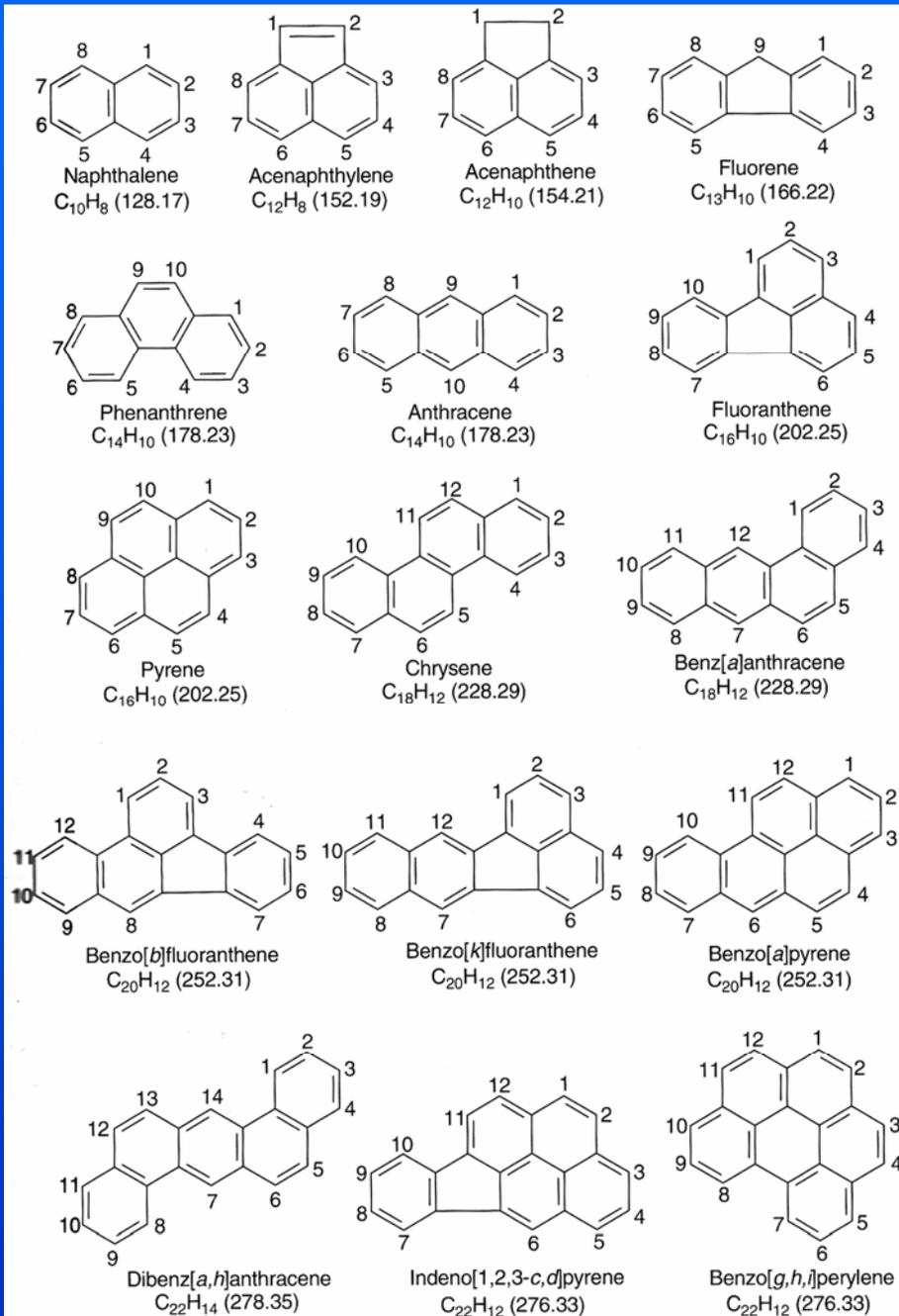
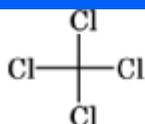
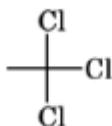


Fig. 1. Structures, chemical formulas, and molecular weights of the 16 EPA priority pollutant PAHs

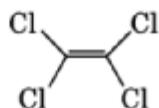
Solventes halogenados



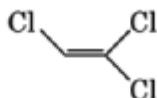
Carbon tetrachloride



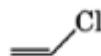
1,1,1-Trichloroethane



Tetrachloroethylene
(perchloroethylene)

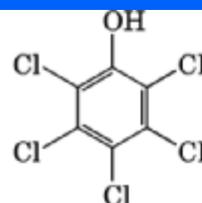


Trichloroethylene

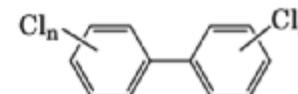


Vinyl chloride

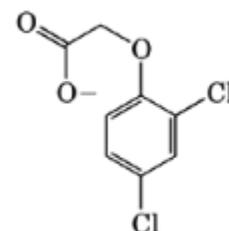
Compuestos aromáticos policlorados (pesticidas) cancerígenos disruptores endocrinos



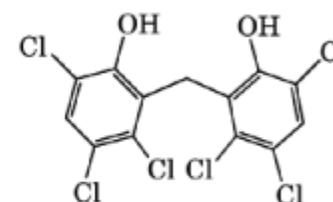
Pentachlorophenol



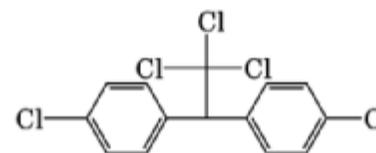
Polychlorinated biphenyl



(2,4-Dichlorophenoxy)acetate

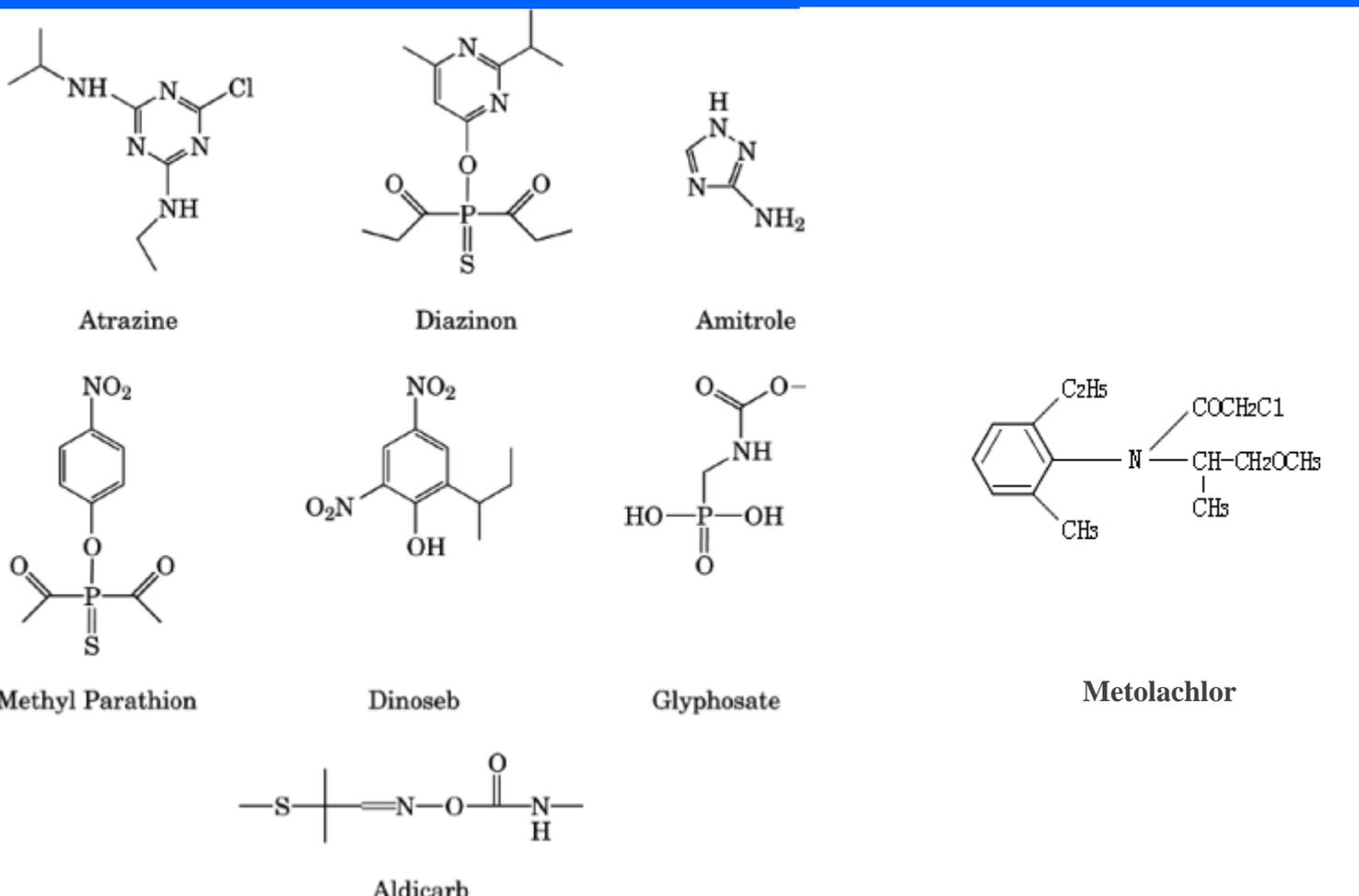


Hexachlorophene



DDT

Nitro compuestos aromáticos y no aromáticos Organofosforados



Herbicidas, plaguicidas prohibidos

Vías de degradación de diversos contaminantes

Aeróbicas:

Mono y dioxigenasas: Monooxigenasas y epoxigenasas del citocromo P450

Enzimas aeróbicas catalizan degradación de alcanos, monoaromáticos , policíclicos, hidrocarburos clorinados, nitroaromáticos.

Monooxigenasas insertan un oxígeno y el otro es reducido como H₂O.

Dioxigenasas insertan ambos oxígenos.

Enzimas ligninolíticas: Ligninoperoxidasas, Manganeso peroxidadas.

Utilizan H₂O₂ como aceptor de electrones y catalizan la oxigenación de diversos compuestos incluyendo los polímeros de lignina.

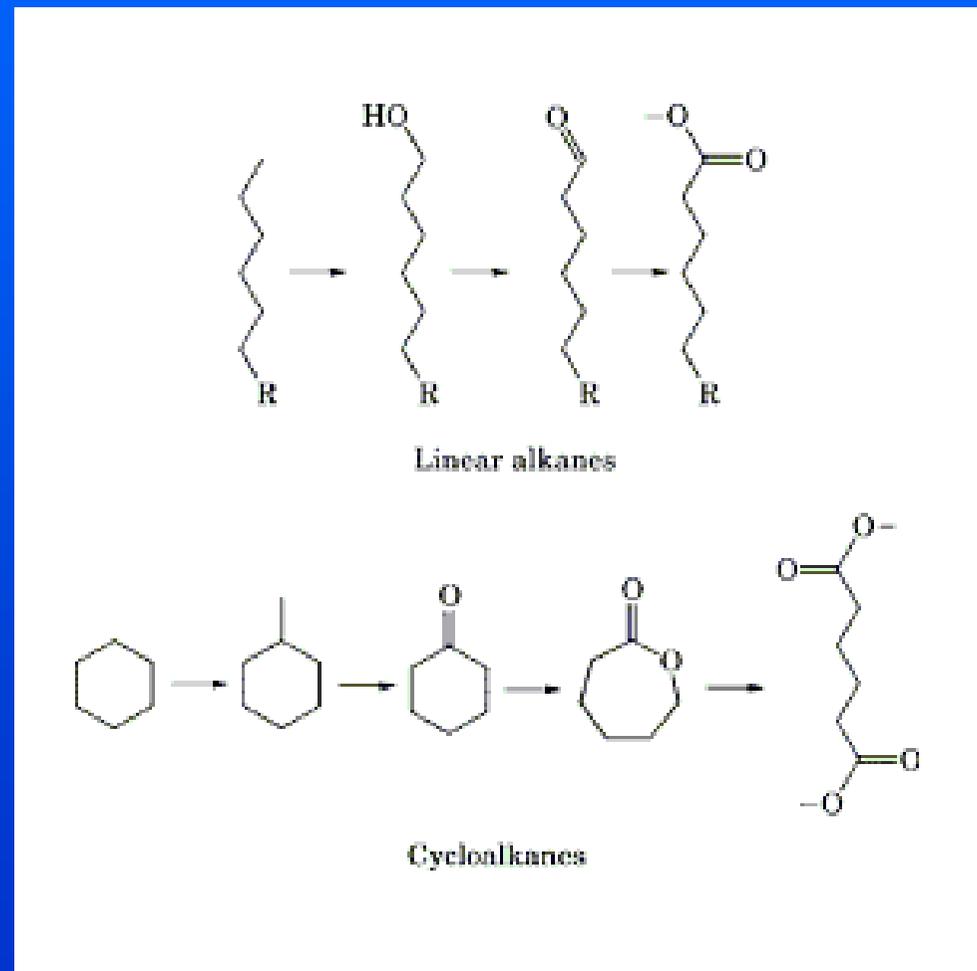
Anaeróbicas:

Decloración reductiva: Dehalogenasas reductoras

Adición de fumarato: Alquil succinato sintetetas

Hidrocarburos lineales y cicloalcanos: biodegradación aeróbica

Numerosas bacterias y hongos degradan hidrocarburos en condiciones aeróbicas. El paso limitante es la inserción de oxígeno mediada por enzimas monooxigenasas y dioxigenasas.



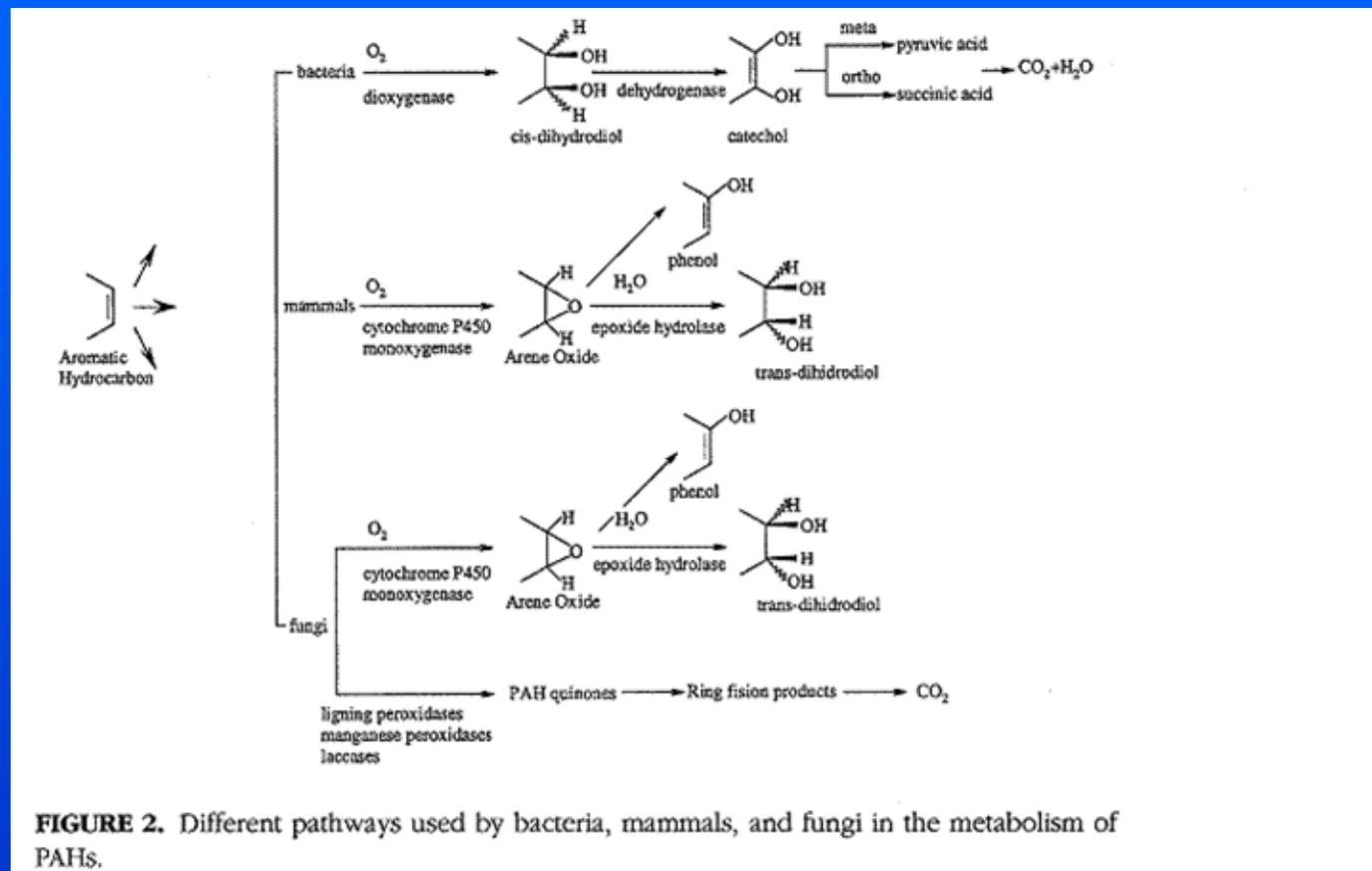
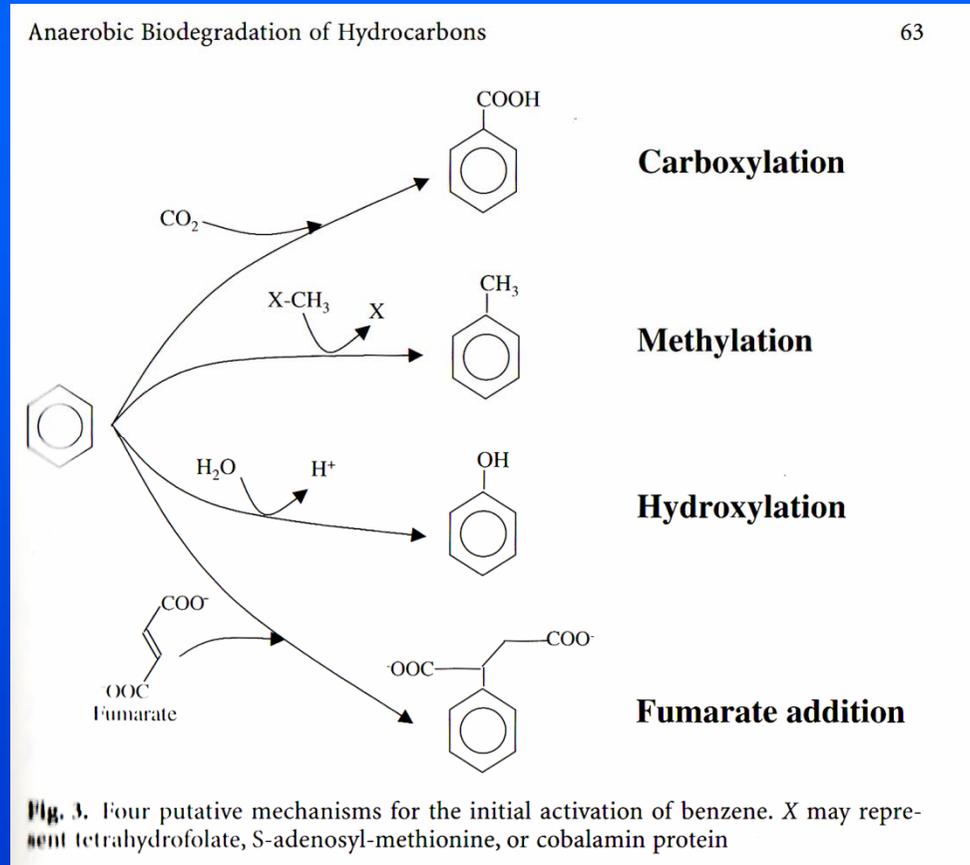


FIGURE 2. Different pathways used by bacteria, mammals, and fungi in the metabolism of PAHs.

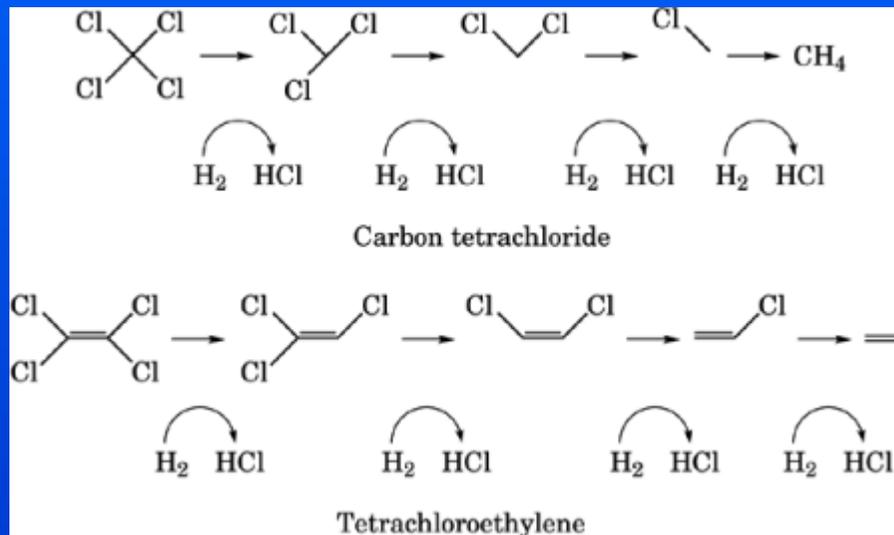
Hydrocarburos monoaromáticos: Biodegradación anaeróbica del Benzeno



Solventes halogenados son degradados en condiciones aeróbicas y anaeróbicas:

Anaeróbicas: Dehalogenación reductiva de un halógeno a la vez, puede ser utilizado como fuente única de carbono.

Aeróbicas: Solventes halogenados son mineralizados por bacterias como co oxidación de otros metabolitos, es mediada por monooxigenasas y dioxigenasas



Dehalogenación reductiva de tetracloruro de carbono y tetracloroetileno

Biorremediación: ventajas y desventajas

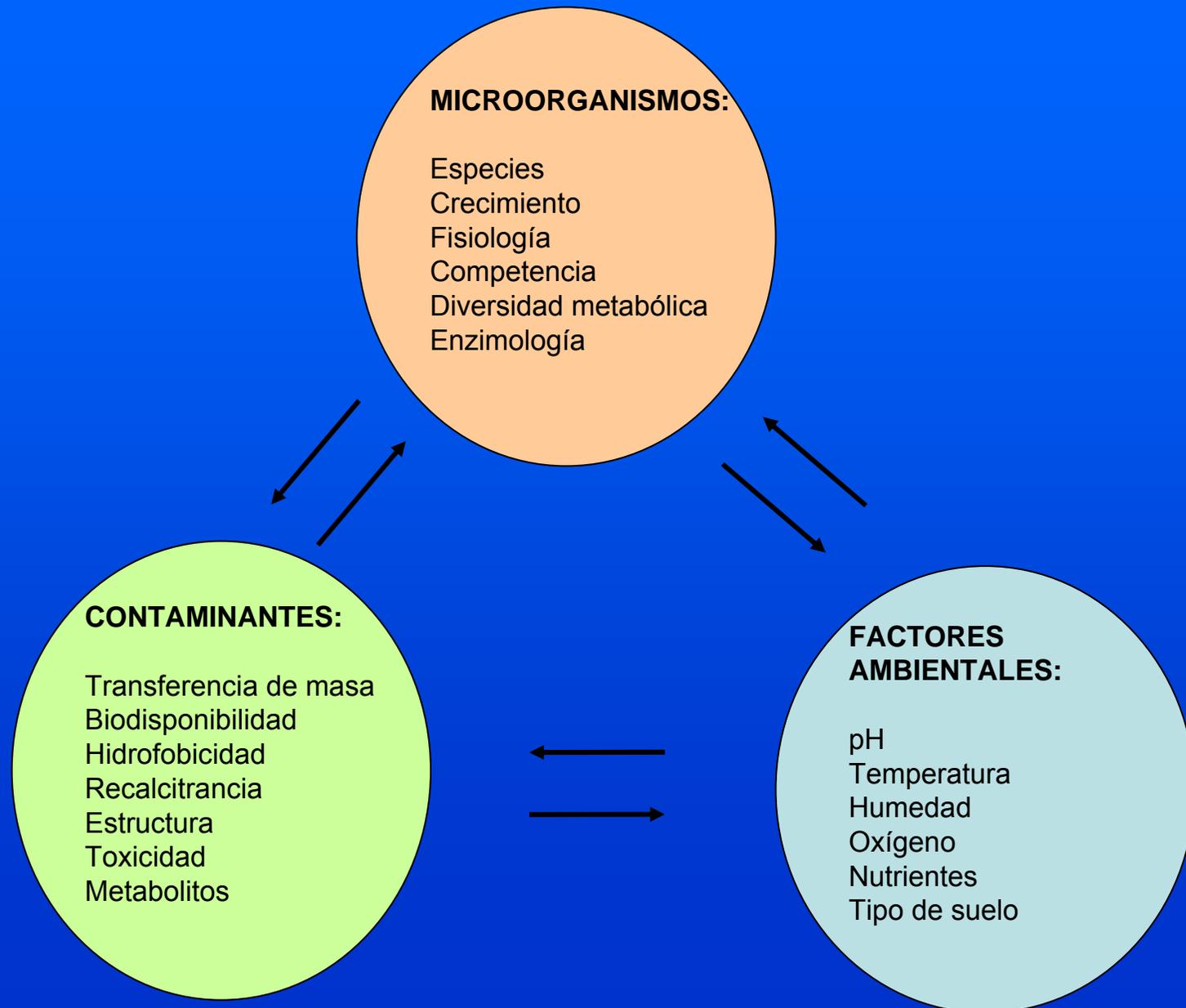
VENTAJAS

- Proceso natural, aceptado por la opinión pública y normativas medioambientales.
- El proceso no corresponde a transferencia de tóxicos de un ambiente a otro sino su degradación final.
- Los residuos del proceso son generalmente inocuos CO_2 , H_2O , biomasa.
- Utilizable para la destrucción de diversos compuestos considerados tóxicos o potencialmente tóxicos para las personas o el medio ambiente.
- Puede realizarse en el mismo lugar o en las cercanías de él, ello no afecta las actividades normales, disminuye el costo y el riesgo potencial de daño a la salud humana o del ambiente debido al traslado de grandes cantidades de material contaminado.

DESVENTAJAS

- Limitado a compuestos biodegradables.
- Algunos productos de biodegradación pueden ser más persistentes o tóxicos que sus precursores.
- Requiere de diversos factores presentes en el sitio: presencia de microorganismos activos, condiciones de crecimiento adecuadas (niveles de nutrientes v/s contaminantes)
- Requiere investigación multidisciplinaria para determinar y optimizar las condiciones de biorremediación.
- Es difícil de extrapolar condiciones del laboratorio o planta piloto al sitio final a remediar.
- Los contaminantes pueden estar en diversas condiciones (disueltos en agua, adsorbidos en rocas, en fase gaseosa, etc.)
- En general toma más tiempo que otros tipos de tratamiento.
- La evaluación del proceso de biorremediación es compleja y límites de eficiencia no están claramente definidos.

FACTORES QUE AFECTAN LA BIORREMEDIACION



Condiciones generales necesarias para la degradación de contaminantes

Optimum environmental conditions for the degradation of contaminants are reported in Table 3.

Table 3 Environmental conditions affecting degradation.

Parameters	Condition required for microbial activity	Optimum value for an oil degradation
Soil moisture	25–28% of water holding capacity	30–90%
Soil pH	5.5–8.8	6.5–8.0
Oxygen content	Aerobic, minimum air-filled pore space of 10%	10–40%
Nutrient content	N and p for microbial growth	C:N:P = 100:10:1
Temperature (°C)	15–45	20–30
Contaminants	Not too toxic	Hydrocarbon 5–10% of dry weight of soil
Heavy metals	Total content 2000 ppm	700 ppm
Type of soil	Low clay or silt content	

BIORREMEDIACION

in situ

Tratamiento de material contaminado en el mismo lugar

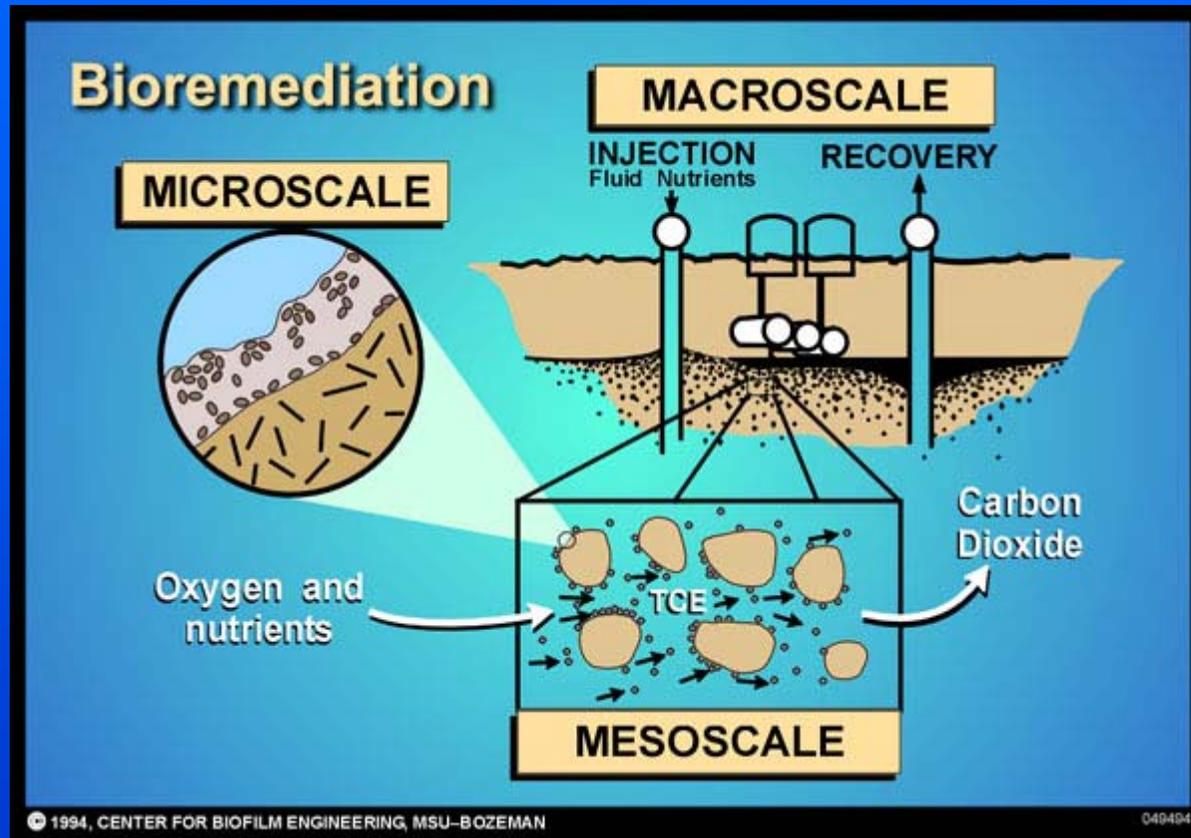
- Biorremediación pasiva
- Biorremediación acelerada:
Bioestimulación (biostarging)
Bioaumentación
- Fitoremediación

ex situ

Tratamiento del material contaminado en un lugar diferente

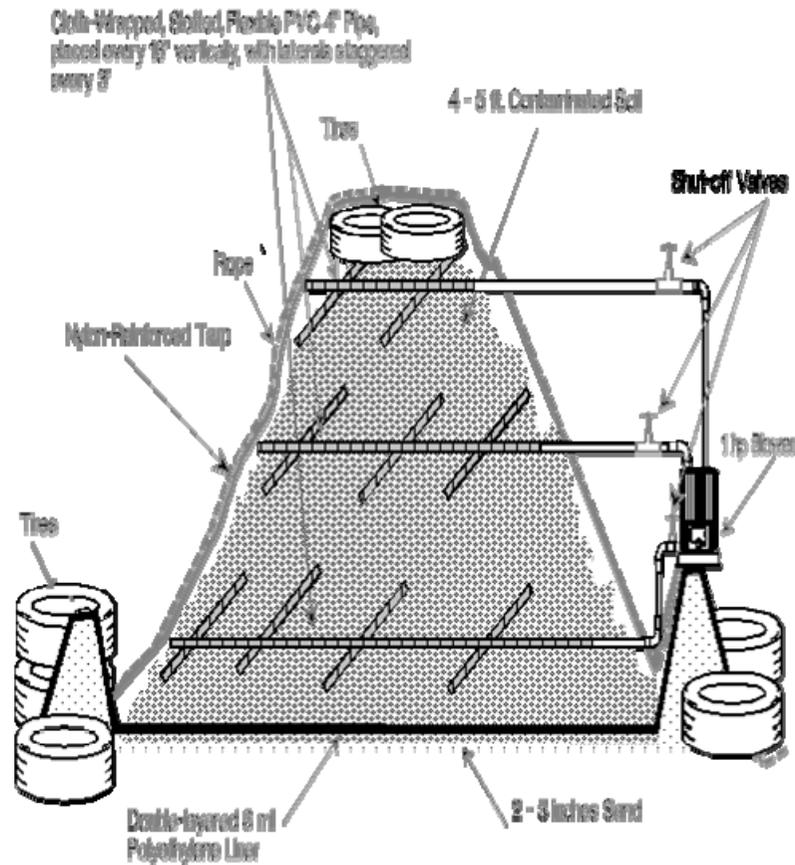
- Bioreactor
- Biopila
- Landfarming
- Composting

Biorremediación *in situ*

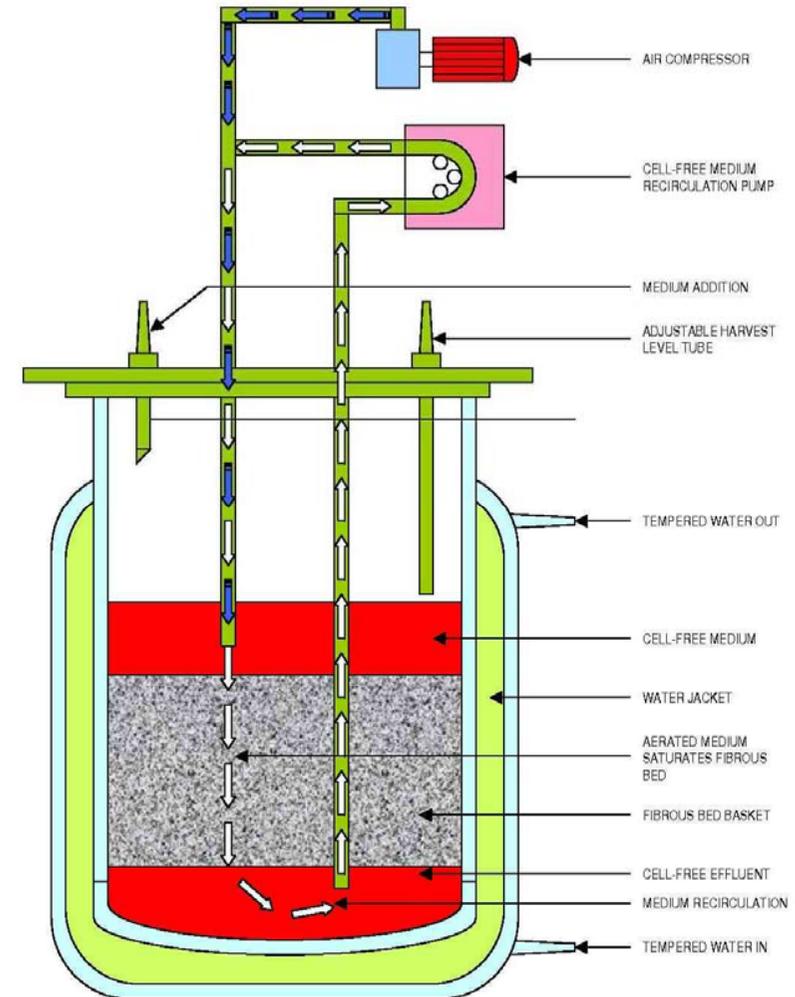


Biorremediación *ex situ*

Design Specifications for Biopile

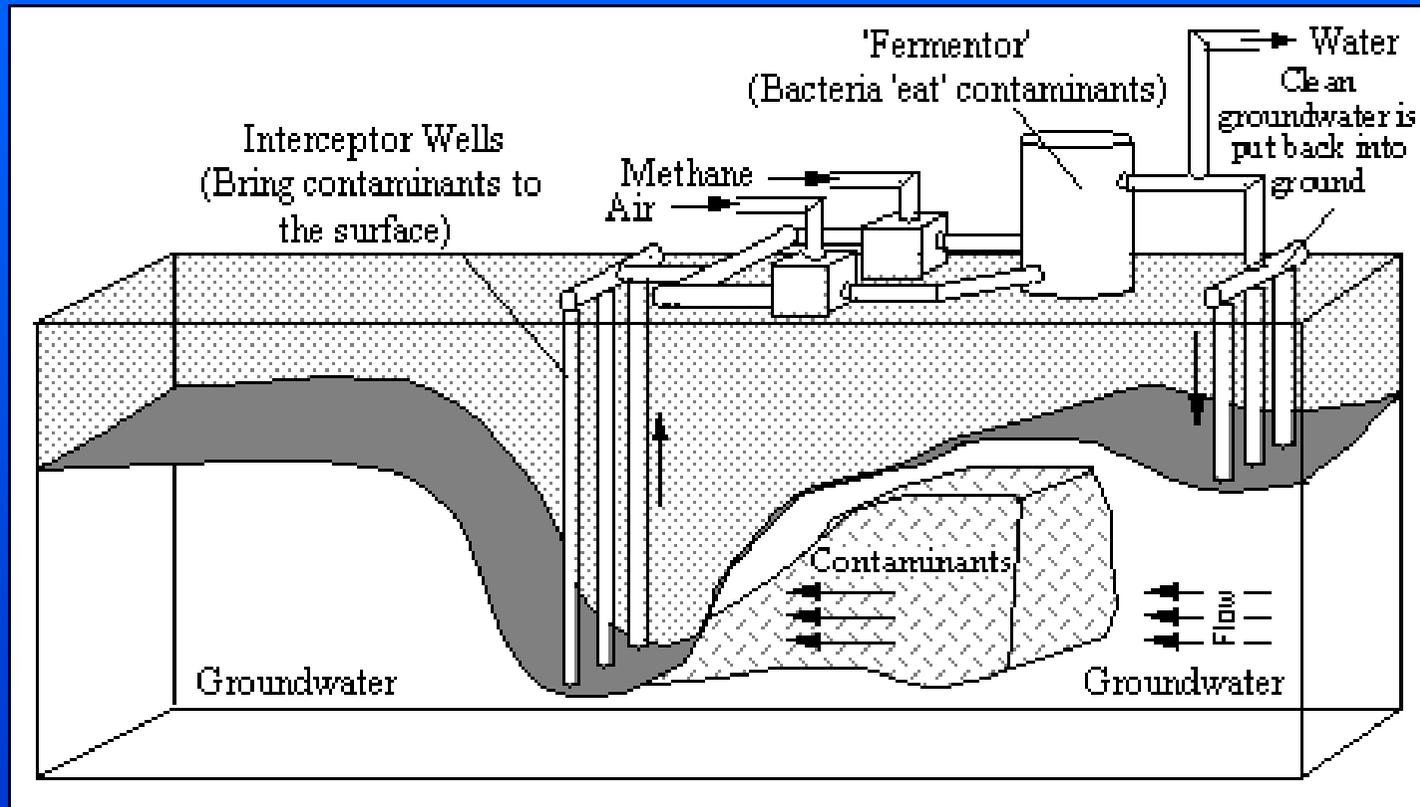


Biopila (fase sólida)

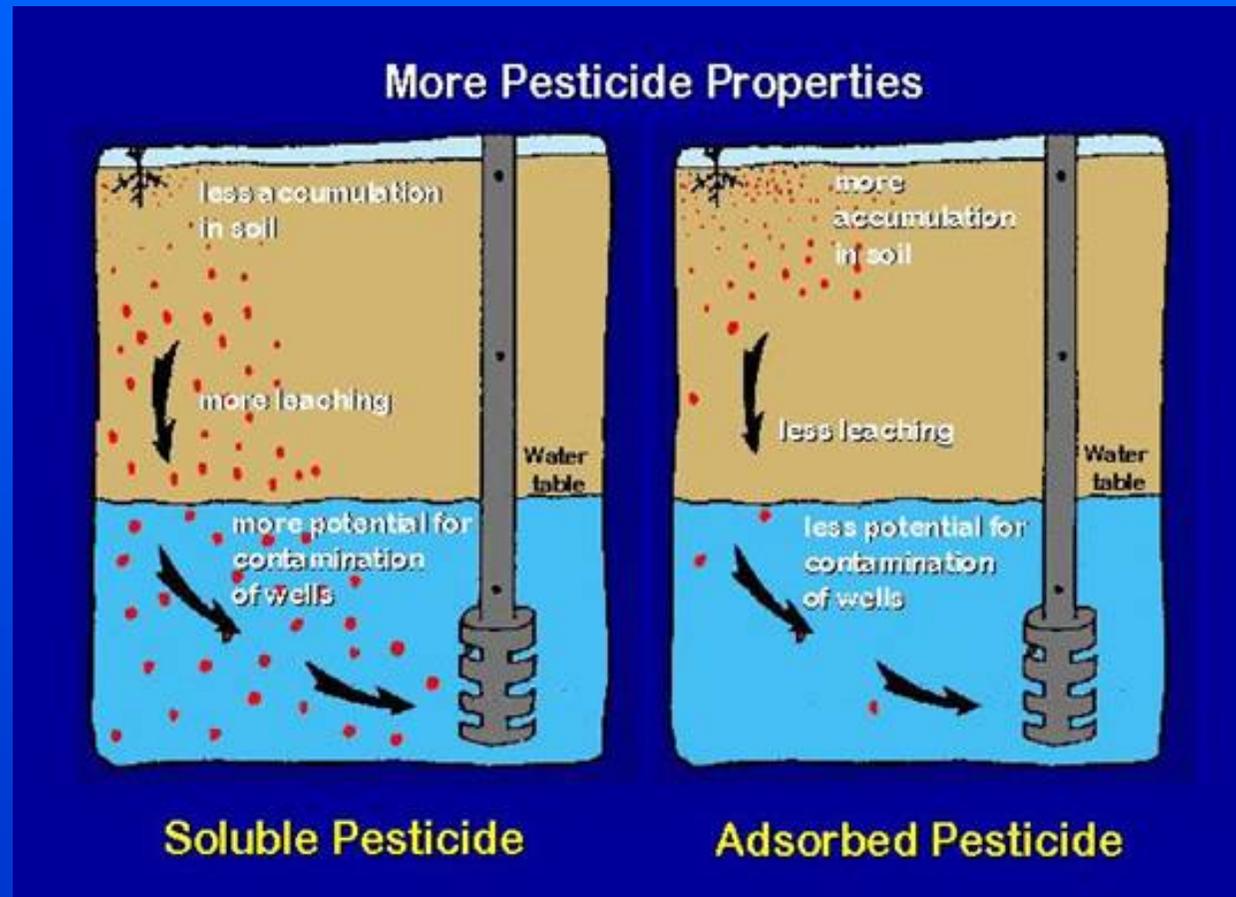


Bio reactor (fase líquida, lodos)

Biorremediación *in situ* usando biorreactores



Las propiedades del contaminante determinan el tipo de biorremediación a realizar



Biorremediación aeróbica y anaeróbica

Proceso	Reaccion	Potencial Redox (E_h en mV)
Aeróbico:	$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$	600 ~ 400
Anaeróbico:		
Denitrificación	$2NO_3^- + 10e^- + 12H^+ \rightarrow N_2 + 6H_2O$	500 ~ 200
Reducción de manganeso IV	$MnO_2 + 2e^- + 4H^+ \rightarrow Mn^{2+} + 2H_2O$	400 ~ 200
Reducción de Hierro III	$Fe(OH)_3 + e^- + 3H^+ \rightarrow Fe^{2+} + 3H_2O$	300 ~ 100
Reducción de sulfato	$SO_4^{2-} + 8e^- + 10 H^+ \rightarrow H_2S + 4H_2O$	0 ~ -150
Fermentación	$2CH_2O \rightarrow CO_2 + CH_4$	-150 ~ -220

Oxígeno es esencial para reacciones aerobicas puede ser entregado como gas o como H_2O_2 en solución
 Potencial redox distinto del O_2 es esencial para reacciones anaerobicas

Para biorremediación *in situ* la evaluación de las condiciones redox del terreno implica multiples puntos para delinear un mapa del estado redox del terreno.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIORREMEDIACIÓN *in situ*

Factores favorables		Factores desfavorables	
Características químicas y biológicas	Características hidrogeológicas	Características químicas y biológicas	Características hidrogeológicas
<ul style="list-style-type: none"> - Abundancia de hidrocarburos alifáticos lineales y escasa presencia de resinas y asfaltenos -Concentraciones bajas contaminantes - Presencia de poblaciones microbianas diversas - Adecuada oxigenación - pH = 6-8 - Temperaturas superiores a 15 °C 	<ul style="list-style-type: none"> - Porosidad media - Elevada permeabilidad -Mineralogía uniforme - Homogeneidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Componentes muy pesados abundantes en la mezcla - Mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos - Concentraciones tóxicas de contaminantes - Escasa actividad microbiana - Ambientes anóxicos - pH extremos -Temperaturas bajas 	<ul style="list-style-type: none"> - Rocas fracturadas - Baja permeabilidad - Compleja mineralogía -Heterogeneidad

Biorremediación *in situ*: Bioestimulación

Modificación del ambiente para estimular el crecimiento o la actividad de bacterias ya existentes.

Adición de nutrientes y aceptores de electrones (fósforo, nitrógeno, oxígeno, o carbono). Generalmente se inyecta aire a la forma de burbujas en el agua o como peróxido de hidrógeno soluble. En los lugares de clima frío donde la temperatura del agua es baja, el uso de calefactores sobre el terreno ayuda a aumentar la temperatura del suelo y la tasa de degradación.

Ventaja: Utiliza organismos presentes en el lugar probablemente más adaptados para dichas condiciones ya distribuidos en la superficie a remediar.

Desventaja: Entrega de nutrientes depende de las características hidrogeológicas del terreno. Terrenos compactos, rocosos, impermeables así como fracturas en la superficie disminuyen distribución de nutrientes.

La bioestimulación *in situ* se usa satisfactoriamente en el tratamiento de suelos, lodos y aguas subterráneas contaminados con hidrocarburos, derivados del petróleo, pesticidas, disolventes, conservantes de la madera y otros químicos contaminantes.

Biorremediación *in situ*: Bioaumentación

Es la introducción exógena de microorganismos nativos o genéticamente modificados para mejorar y acelerar el proceso de biorremediación del suelo o agua.

Generalmente requiere del estudio de los microorganismos presentes en el sitio y su capacidad para realizar la remediación deseada. Esta sujeta a las restricciones de geología e hidrogeología ya descritas para la bioaumentación.

Ventaja: Aceleramiento y optimización del proceso de remediación

Desventaja: Alteración del ecosistema bacteriano del lugar y/o introducción de microorganismos genéticamente modificados.

Table 1. Isolated bacteria capable of degrading aromatic compounds (incomplete list).

Bacterial species	Strains	Aromatics	References
<i>Achromobacter</i> sp.	NCW	CBZ	[106]
<i>Alcaligenes denitrificans</i>		FLA	[73]
<i>Arthrobacter</i> sp.	F101	FLE	[41]
<i>Arthrobacter</i> sp.	P1-1	DBT, CBZ, PHE	[57, 108]
<i>Arthrobacter sulphureus</i>	RKJ4	PHE	[56]
<i>Acidovorax delafieldii</i>	P4-1	PHE	[56]
<i>Bacillus cereus</i>	P21	PYR	[87]
<i>Brevibacterium</i> sp.	HL4	PHE	[56]
<i>Burkholderia</i> sp.	S3702, RP007, 2A-12TNFYE-5, BS3770	PHE	[32, 50, 143]
<i>Burkholderia</i> sp.	C3	PHE	[57]
<i>Burkholderia cepacia</i>	BU-3	NAP, PHE, PYR	[10]
<i>Burkholderia cocovenenans</i>		PHE	[59]
<i>Burkholderia xenovorans</i>	LB400	BZ, BP	[133]
<i>Chryseobacterium</i> sp.	NCY	CBZ	[106]
<i>Cyclocasticus</i> sp.	P1	PYR	[88]
<i>Jamibacter</i> sp.	YY-1	DBF, FLE, DBT, PHE, ANT, DD	[116]
<i>Marinobacter</i>	NCE312	NAP	[30]
<i>Mycobacterium</i> sp.		PYR, BaP	[4, 68, 75, 76, 83, 93, 144]
<i>Mycobacterium</i> sp.	JS14	FLA	[68]
<i>Mycobacterium</i> sp.	6PY1, KR2, AP1	PYR	[78, 85, 139]
<i>Mycobacterium</i> sp.	RJGII-135	PYR, BaA, BaP	[79]
<i>Mycobacterium</i> sp.	PYR-1, LB501T	FLA, PYR, PHE, ANT	[49, 67, 70, 77, 87, 145]
<i>Mycobacterium</i> sp.	CH1, BG1, BB1, KR20	PHE, FLE, FLA, PYR	[40, 51, 52, 69]
<i>Mycobacterium flavescens</i>		PYR, FLA	[65, 82]
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i>	PYR-1	PHE, PYR, dMBaA	[61, 126]
<i>Mycobacterium</i> sp.	KMS	PYR	[84]
<i>Nocardioides aromaticivorans</i>	IC177	CBZ	[110]
<i>Pasteurella</i> sp.	IFA	FLA	[146]
<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	CJ2	NAP	[153]
<i>Pseudomonas</i> sp.	C18, PP2, DLC-P11	NAP, PHE	[27, 55, 56]
<i>Pseudomonas</i> sp.	BT1d	HFBT	[119]
<i>Pseudomonas</i> sp.	B4	BP, CBP	[136]
<i>Pseudomonas</i> sp.	HH69	DBF	[104]
<i>Pseudomonas</i> sp.	CA10	CBZ, CDD	[109]
<i>Pseudomonas</i> sp.	NCIB 9816-4	FLE, DBF, DBT	[113]
<i>Pseudomonas</i> sp.	F274	FLE	[47]

Table 1. Cont.

<i>Pseudomonas paucimobilis</i>		PHE	[73]
<i>Pseudomonas vesicularis</i>	OUS82	FLE	[73]
<i>Pseudomonas putida</i>	P16, BS3701, BS3750, BS590-P, BS202-P1	NAP, PHE	[33, 50]
<i>Pseudomonas putida</i>	CSV86	MNAP	[125]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BS3760	PHE, CHR, BaA	[50, 147]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	P15	PYR	[87]
<i>Pseudomonas saccharophilia</i>		PYR	[87]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		PHE	[148]
<i>Ralstonia</i> sp.	SBUG 290	DBF	[103]
	U2	NAP	[152]
<i>Rhodanobacter</i> sp.	BPC-1	BaP	[149]
<i>Rhodococcus</i> sp.		PYR, FLA	[65, 86]
<i>Rhodococcus</i> sp.	WU-K2R	NAT, BT	[121]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	I-19	ADBT	[120]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	D-1	DBT	[122]
<i>Staphylococcus</i> sp.	PN/Y	PHE	[63]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	VUN 10.010	PYR, FLA, BaP	[64, 90]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	VUN 10.003	PYR, FLA, BaA, BaP, DBA, COR	[66, 95]
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	R1	PYR	[87]
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i>	JAR02	BaP	[100]
<i>Sphingomonas</i> sp.	P2, LB126	FLE, PHE, FLA, ANT	[54, 71, 72, 150]
<i>Sphingomonas</i> sp.		DBF, DBT, CBZ	[105]
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	EPA505	FLA, NAP, ANT, PHE	[36, 151]
<i>Sphingomonas wittichii</i>	RW1	CDD	[112]
<i>Terrabacter</i> sp.	DBF63	DBF, CDBF, CDD, FLE	[48, 109, 117]
<i>Xanthamonas</i> sp.		PYR, BaP, CBZ	[93]

PYR, pyrene; BaP, Benzo[*a*]pyrene; PHE, phenanthrene; FLA, fluoranthene; FLE, fluorene; ANT, anthracene; NAP, naphthalene; BaA, benz[*a*]anthracene; dMBaA, dimethylbenz[*a*]anthracene; DBA, dibenz[*a,h*]anthracene; COR, coronene; CHR, chrysene; DBF, dibenzofuran; CDBF, chlorinated dibenzothophene; HFBT, 3-hydroxy-2-formylbenzothiophene; BP, biphenyl; CBP, chlorobiphenyl; NAT, naphthothiophene; BT, benzothiophene; BZ, benzoate; ADBT, alkylated dibenzothiophene; CBZ, carbazole; DD, dibenzo-*p*-dioxin; CDD, chlorinated dibenzo-*p*-dioxin; MNAP, methyl naphthalene.

Diseño de microorganismos para biorremediación

Objetivos:

Crear nuevas rutas metabólicas (clonamiento y expresión de genes en tandem)

Evitar la formación de intermediarios inhibitorios

Generación de proteínas recombinantes para incrementar el rango de sustratos metabolizables (ej: enzimas modificadas genéticamente)

Aumentar el acceso a los sustratos (producción de biosurfactantes, sequestradores de metales, diseño de proteínas secretorias o de superficie celular)

Mejorar la estabilidad genética

Generación de vectores transferibles a la población bacteriana

Establecer mecanismos de control de crecimiento (genes de muerte)

Estrategias:

- Evolución dirigida
Crecimiento bajo condiciones de presión selectiva en presencia de contaminantes.
- Manipulación genética mediante técnicas de DNA recombinante.

Tab. 1. Genetic Engineering for Biodegradation of Contaminants

Microorganism	Modification	Contaminants	Reference
<i>Pseudomonas</i> sp. B13	pathway	mono/dichlorobenzoates	REINEKE and KNACKMUSS, 1979, 1980
<i>P. putida</i>	pathway	4-ethylbenzoate	RAMOS et al., 1987
<i>P. putida</i> KT2442	pathway	toluene/benzoate	PANKE et al., 1998
<i>Pseudomonas</i> sp. FR1	pathway	chloro-, methylbenzoates	ROJO et al., 1987
<i>C. testosteroni</i> VP44	substrate specificity	<i>o</i> -, <i>p</i> -monochlorobiphenyls	HRYWNA et al., 1999
<i>Pseudomonas</i> sp. LB400	substrate specificity	PCB	ERICKSON and MONDELLO, 1993
<i>E. coli</i> JM109(pSHF1003)	substrate specificity	PCB, benzene, toluene	KUMAMMRU et al., 1998
<i>P. pseudoalcaligenes</i> KF707-D2	substrate specificity	TCE, toluene, benzene	SUYAMA et al., 1996
<i>E. coli</i> FM5/pKY287	regulation	TCE, toluene	WINTER et al., 1989

Tab. 2. Genetic Engineering for Biodegradation Process Efficacy

Microorganism	Application	Contaminants	Reference
<i>A. eutrophus</i> H850Lr	process monitoring	PCB	VAN DYKE et al., 1996
<i>P. putida</i> TVA8	process monitoring	TCE, BTEX	APPLEGATE et al., 1998
<i>P. fluorescens</i> HK44	process monitoring	naphthalene, anthracene, phenanthrene	SAYLER et al., 1999
<i>B. cepacia</i> BRI6001L	strain monitoring	2,4-D	MASSON et al., 1993
<i>P. fluorescens</i> 10586s/pUCD607	stress response	BTEX	SOUSA et al., 1998
<i>P. fluorescens</i> 10586s/pUCD607	toxicity assessment	chlorobenzenes, chlorophenols, BTEX	BOYD et al., 1998; SINCLAIR et al., 1999; GLOVER et al., 1999
<i>Pseudomonas</i> strain Shk1	toxicity assessment	Cd, 2,4-dinitrophenol, hydroquinone	KELLY et al., 1999
<i>A. eutrophus</i> 2050	end point analysis	nonpolar narcotics	LAYTON et al., 1999

ASPECTOS IMPORTANTES PARA LA PLANIFICACION DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACION *in situ*:

- Caracterización de los contaminantes y su distribución en el terreno
- Caracterización del terreno determinar características geológicas e hidrogeológicas. (Ej presencia y velocidad de aguas subterráneas)
- Selección de los nutrientes y condiciones de biorremediación. Ej: Oxígeno (proceso aerobico) y/o poder reductor (proceso anaeróbico), necesidad de calefacción o electroestimulación.
- Optimización de acceso a nutrientes y contaminantes: Vías de inyección o entrega de nutrientes, uso de biosufractantes.
- Evaluar uso de procesos químicos y/o físicos complementarios a la biorremediación
- Determinar las vías metabólicas principales y la posible producción de metabolitos inhibitorios o tóxicos.
- Diseñar e implementar métodos de evaluación del proceso de biorremediación: NMP, BIOLOG, determinación de sustratos, productos y metabolitos intermediarios.

Esencial un estudio piloto previo a la biorremediación full scale.

Biorremediación *ex situ*

Landfarming: Deposito de material contaminado en sitios excavados bajo techo, con movimiento del terreno, humidificación y aireación. Muchas veces los contaminantes son removidos por volatilización mas que por degradación.

Composting: Material contaminado es mezclado con residuos vegetales (forraje, desechos de agricultura), apilados como en las biopilas y agitados como en landfarming.

Biopila: Deposito de material contaminado en pilas cubiertas con ventilación y entrega de nutrientes en agua mediante cañerías, los contaminantes y productos de biorremediación son recolectados de los percolados de la biopila.

Biorreactor:

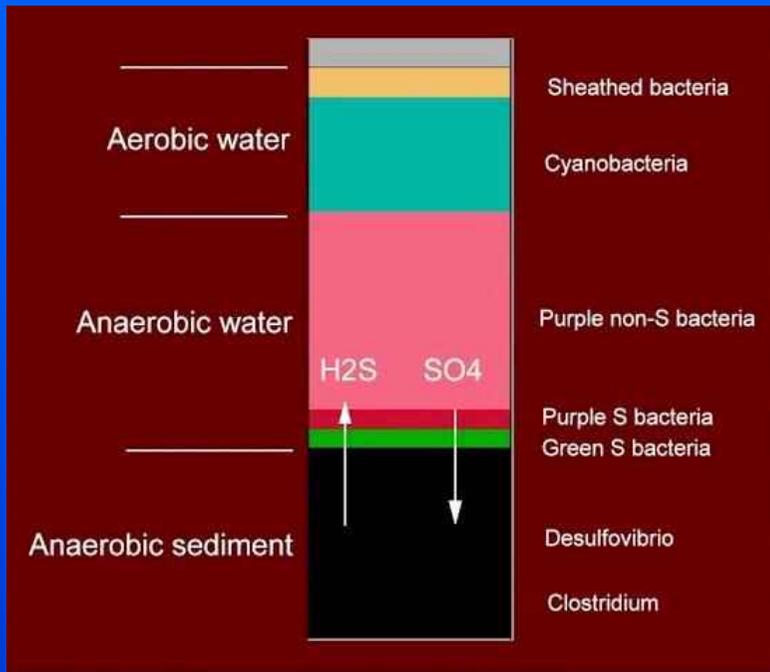
Recipiente cerrado con agitación, oxigenación, temperatura, pH y humedad controladas con sensores y sistemas de toma de muestra que permiten evaluar la biorremediación En tiempo real. Preferentemente utilizado en biorremediación anaeróbica.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA BIORREMEDIACIÓN *ex situ*

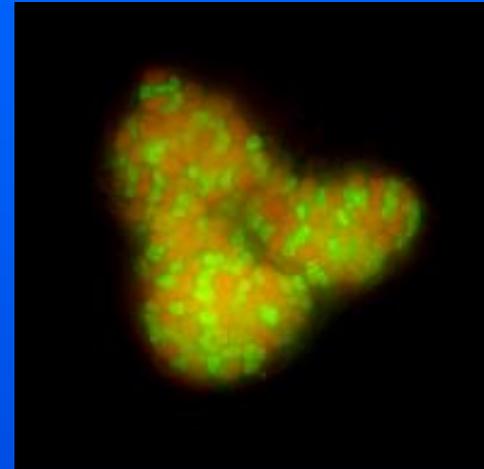
Factores favorables		Factores desfavorables	
Proceso mas rápido		Costo de transporte y almacenamiento	
Bajo condiciones controladas		Mayor gasto energético	
Mayor rango de compuestos		Impacto en el medio ambiente por remoción del terreno o agua	
Permite el uso de distintos microorganismos		Requiere espacios amplios y controlados	
Fácil de monitorear		Riesgo de impacto en la población.	

Comunidades bacterianas

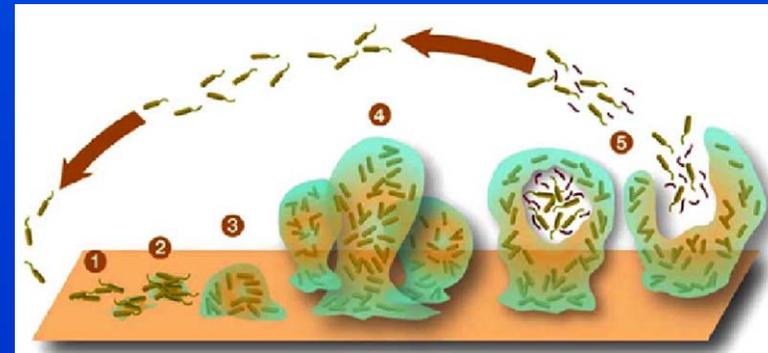
Distribución en escala macroscópica



Distribución en escala microscópica:



Consortios bacterianos



Biofilm

Caracterización de poblaciones bacterianas

Métodos no moleculares:

- Cultivo e identificación en placa obtención de Número más probable (NMP), solo identifica aquellos microorganismos cultivables.
- Caracterización de ácidos grasos de fosfolípidos bacterianos (ácidos grasos ramificados, hidroxilados, de cadena impar, etc).

Métodos moleculares:

- Reacción en cadena de polimerasa (PCR) para regiones variables de los genes que codifican para 16S rRNA.
- PCR y electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE)
- Amplificación de regiones de los 16S rRNAs y corte de secuencias con enzimas de restricción (T-RFLP)
- Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH): sondas específicas para regiones 16S rRNA unida a colorante fluorescente, visualización al microscopio y/o recuento por citometría de flujo.

Estas técnicas no necesariamente reflejan la población bacteriana total ni permiten evaluar la actividad de un microorganismo y su contribución a la biorremediación

Biodisponibilidad

Eficiencia de proceso de biorremediación depende de el acceso del contaminante a la maquinaria enzimática del microorganismo.

Propiedades fisicoquímicas del contaminante:

Contaminante sólido, gas, líquido.
Solubilidad en agua, adsorción, desorción.

Propiedades del microorganismo:

Producción de enzimas secretorias
Producción de biosurfactante
Sensores y quimiotaxis
Presencia de proteínas de superficie (moléculas de adhesión, receptores y/o transportadores de contaminantes).
Disponibilidad de coactivadores y/o cosustratos.

Evaluación de los procesos de biorremediación:

Métodos no moleculares

- Cultivo y número mas probable de organismos con actividad catalitica (NMP)
- Patrones de utilización de sustrato (BIOLOG)
- Respirometría (metabolismo aeróbico), evaluación del potencial redox (metabolismo anaeróbico)
- Análisis de biomasa (acido muriámico para bacterias, ergosterol para hongos)
- Análisis de la formación de sub productos, metabolitos o desaparición de sustratos en el terreno, aguas contaminadas y/o percolados de pilas de biorremediación. Uso de técnicas de análisis químico.
- Predicción de biodegradabilidad mediante modelos (QSBRs)
- Acidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs)
- Enzimas en suelo (deshidrogenasas, lipasas, ureasas, fosfatasas ácidas y alcalinas)
- Métodos inmunoquímicos (Elisa para el contaminante, inmunofluorescencia directa)

Evaluación de los procesos de biorremediación:

Metodos Moleculares:

Razón rDNA/rRNA 16S (RNA aumentado en condiciones de alto metabolismo)

FISH

PCR / microarray para genes catabólicos especie específicos

Biosensores

Table 2. Biological methods for monitoring and assessment of bioremediation processes

Method	Comments
Plating	Only a small proportion of microbial community involved is detected, isolates not necessarily reflective of a specific metabolic function
MPN	Metabolic function of interest detected, selective media may limit proportion of community detected
BIOLOG	Overall metabolic activity detected, rapid and easy to use, selective media may limit proportion of community detected, sensitive to inoculum size
Staining for active microbes	Enumerate live microorganisms, no bias from culture media, does not differentiate microorganisms with catabolic activity of interest
PFLA	Changes in signature fatty acid can indicate change in community structure
Soil enzymes	Soil enzymes such as dehydrogenases, lipases etc. can be considered attractive indicators for monitoring impacts of contaminated soils
Immunochemical	Based on interaction of an antigen (pollutant) and an antibody (detector), depending on quality of the antibodies, intact specific organism can be detected, laborious counting unless coupled to flow cytometric methods
Protein banding	No selection pressure if extracted directly, no measurement of community function, difficult to link fingerprints to specific microbial groups
MPN-PCR	Number of target DNA in environmental samples can be detected, only semi-quantitative determinations possible
DNA:DNA hybridization	Abundance of gene fragments can be determined, this relatively fast method can be performed on bacterial colonies or on isolated DNA
fiSH	Spatially visualize specific microorganisms in an environment, not necessarily detecting active microorganisms, laborious technique
RSGP	Quantitative analysis of specific microorganisms in environmental samples, limited to those microorganisms included in the screen
PCR-DGGE	Can identify microorganisms by sequencing resolved bands, bulk changes in community structure detected, differential DNA or RNA extraction from different cells, no information on activity
Microarray	Rapid method for automated determination composition and abundance of species within a microbial community
Probes for specific metabolic genes	Detect genes with function of interest, mRNA detection can reveal information about expression, limited to known genes, activity cannot be inferred from presence of genes alone
Bacterial sensors	Constructed by fusing a reporter gene to a promoter element induced by the target compound, offer the possibility to characterize the biodegradability of specific contaminants present in a complex mixture without pretreatment of the environmental samples

Métodos analíticos para estimar el grado de biorremediación

Table 1. Biodegradation estimation methods for monitoring and assessment of bioremediation processes

Method	Comments
Gas chromatography (GC)	Commonly used technique to separates complex mixture of hydrocarbons into its components; high sensitivity, accurate identification
High performance liquid chromatography (HPLC)	Used commonly for analysis of various contaminants and their (bio)transformation products
Thin layer chromatography-flame ionization detector (TLC-fid)	Fast method, a number of samples can be replicated and run in a short period; good sensitivity and easy to use
Respirometry	Quantified by the consumption of molecular oxygen or evolution of carbon dioxide using respirometry
Spectroscopic	For example, X-ray diffraction, Ramans spectroscopy and high resolution electron diffraction; surface-sensitive technique to determine biotransformation of metals, due to dehydrated samples real-time measurement difficult
Fluorescence	Useful in identification of hydrocarbons; commonly used in coastal oil spill monitoring
Total petroleum hydrocarbons (TPH)	Gravimetric; infra-red or GC method; oil and grease analysis
Solid-phase microextraction (SPME)	Determination of volatile and semivolatile compounds during biodegradation of oily sludge
Toxicity characteristics leachate procedure (TCLP)	Measurement of toxic and mobile hydrocarbons in sample leachates
Quantitative structure biodegradability relationships (QSBR)	The QSBRs are correlations between molecular structure, activity and biodegradation; commonly employ simple or multiple regression analyses and predicts biodegradability in terms of biodegradation rates and constants, half-lives, theoretical oxygen demand (ThOD), biochemical oxygen demand (BOD).

Mecanismos mixtos de remediación abióticos +bióticos

Reacciones químicas o procesos físicos que complementan los procesos de Biorremediación.

Ejemplos:

- Reacciones de fenton en hongos ligninolíticos
- Fotocatálisis mediada por TiO_2
- Oxidación por Ozono, Permanganato, Ion ferrato (FeVI)

Reacción de Fenton



Ejemplos de remediación abiótica/biótica

Mineralización de TNT foto catálisis +hongos

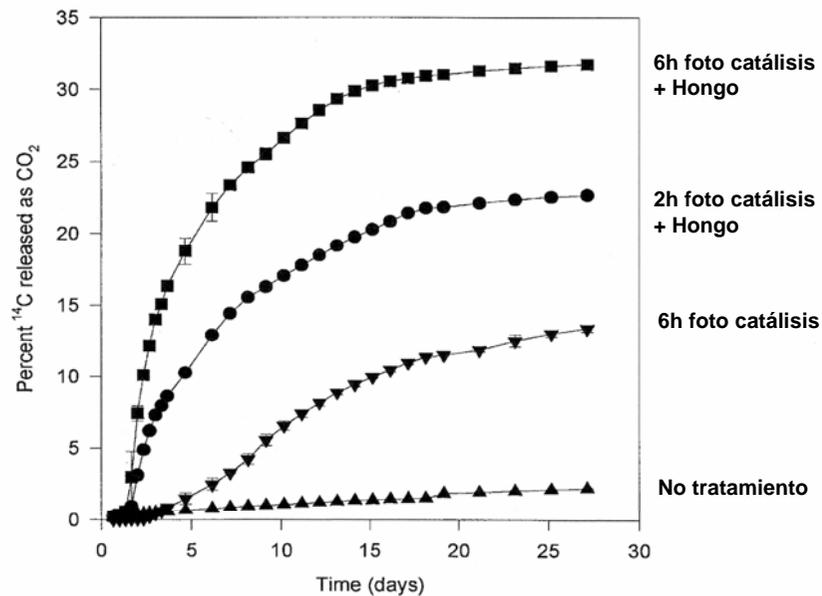


Fig. 2. Combined photocatalytic/fungal treatment of TNT showing an approximate 30% improvement in mineralization extent using the combined process over photocatalysis alone (100 mg/l initial TNT concentration). Data are from fungal degradation of: 6-h (filled squares) and 2-h (filled circles) photocatalytic pretreatment products, an uninoculated aliquot of 6-h photocatalysis products (filled inverted triangles), and [U-¹⁴C]-TNT alone (filled triangles) (Adapted from Hess et al. 1996)

Mineralización de TNT reacción Fenton+hongos

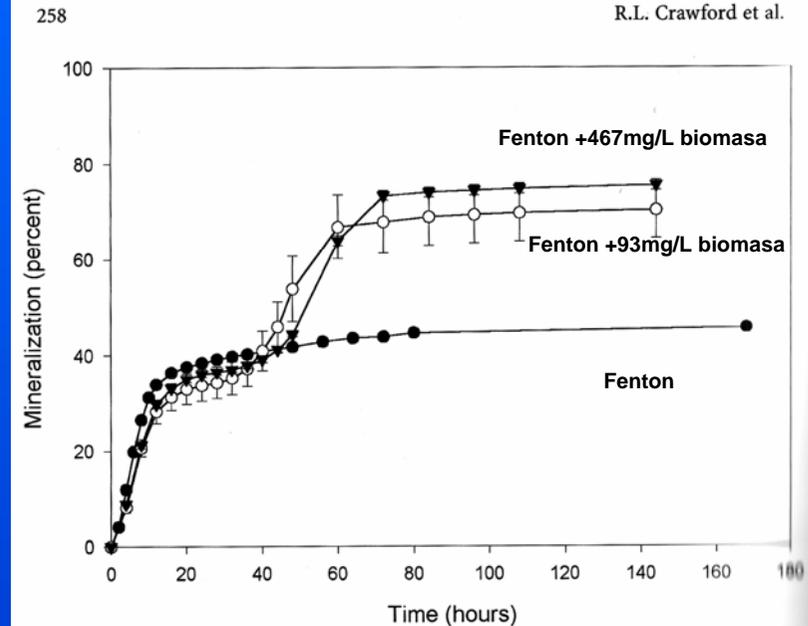


Fig. 3. Kinetic profiles showing an approximate 33% increase in TNT mineralization extent (aqueous solution) in combined abiotic/biotic reactions compared to Fenton reactions alone. Abiotic Fenton reactions alone (filled circles) and coupled abiotic/biotic reactions with two concentrations of biomass (filled inverted triangles = 467 mg/l; open circles = 93 mg/l) (Adapted from Hess and Schrader 2002)

Fitoremediación

Tratamiento de terrenos contaminados a través del uso de plantas
Generalmente utilizado para biorremediar metales pesados

- **Fitoacumulación:** Concentración de contaminantes en el tejido de la planta
- **Fitotransformación y degradación:** Metabolización de los contaminantes por la planta
- **Fito estabilización:** La presencia de la planta disminuye la dispersión y movilización de algunos contaminantes.
- **Fitoestimulación:** La presencia de las plantas mejora el crecimiento de microorganismos remediadores.

Ventajas: Barato, amigable con el medio ambiente, fácil de monitorear, permite Recuperar metales valiosos.

Desventajas: Limitado a la superficie y alcance de las raíces, sistema lento y requiere mucha biomasa, depende del suelo y toxicidad del compuesto, puede afectar la cadena alimentaria por consumo de la planta.