
BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN QUÍMICA EN COMUNIDADES MICROBIANAS

LORELEI BOZO, MILAGRO FERNÁNDEZ, MARIELA LÓPEZ,
ROSA REYES y PAULA SUÁREZ

RESUMEN

Los efectos de sustancias tóxicas sobre un ecosistema se inician con una reacción bioquímica en el individuo, respuesta inicial que ocurre a los niveles de organización biológica más bajos, es reversible y específica. Subsecuentemente, con el incremento del impacto, tiene lugar una secuencia de alteraciones en niveles de organización más complejos, con perturbación de funciones vitales y muerte. Los biomarcadores pueden ser definidos a cualquier nivel de organización biológica. A mayor nivel de organización la sensibilidad, especificidad y precisión de las respuestas suelen disminuir, mientras que la relevancia ecológica aumenta. Dada la importancia de las comunidades microbianas para la homeostasis de los ecosistemas y la gravedad de la contaminación química actual, se revisan las principales respuestas de las comunidades microbianas a los contaminantes químicos.

Se reseñan los principales tipos de biomarcadores de contaminación, sus ventajas, desventajas y aplicaciones, así como las respuestas más usuales observadas en comunidades microbianas frente a la contaminación química. Se concluye que las comunidades microbianas son importantes bioindicadores de la contaminación de aguas por materia orgánica, evidenciado por el incremento poblacional en respuesta a estos contaminantes. Igualmente, la inducción de la síntesis de metalotioninas puede considerarse como una señal de alarma temprana ante la contaminación por metales pesados. Finalmente, la capacidad de comunidades microbianas para utilizar ciertos compuestos poliaromáticos como fuente de energía y carbono, permite su utilización como herramienta de biorremediación ante derrames de petróleo y otros compuestos orgánicos.

La necesidad de investigar y detectar el impacto de la contaminación por compuestos químicos en la calidad ambiental, ha llevado a estudiar y desarrollar “marcadores” de los efectos biológicos de los contaminantes sobre los organismos vivos (Livingstone, 1993; Reyes, 1999; Capó, 2002). En este respecto, el deterioro de la salud ambiental puede ser causado por el modo sinérgico de la acción de una mezcla compleja de contaminantes. La mayoría de las fuentes consultadas sugieren el desconocimiento de las interacciones causales entre la contami-

nación ambiental y la respuesta biológica (Livingstone, 1993; Bucheli y Fent, 1995; Depledge *et al.*, 1995; Melacon, 1995; Capó, 2002; de Acevedo y da Mata, 2003). Las herramientas convencionales para monitoreo ambiental pueden evaluar los niveles de contaminantes y el estado de salud ambiental, pero no la interrelación entre ambos, mientras que el uso de biomarcadores puede relacionar causa y efecto (Bucheli y Fent, 1995; Capó, 2002).

Es ampliamente aceptado que los efectos de las sustancias tóxicas sobre un ecosistema se inician con una reacción

bioquímica en el individuo. Esta respuesta inicial ocurre en niveles de organización biológica más bajos y es altamente reversible y específica. Subsecuentemente, con el incremento del impacto, se inicia una secuencia de alteraciones dentro de los niveles más complejos, llevando a la perturbación de las funciones vitales y/o a la muerte del organismo. En esta situación, los efectos pueden aparecer a nivel de poblaciones enteras y eventualmente, en el ecosistema. Así, los biomarcadores pueden ser definidos a cualquier nivel de organización biológica (Bucheli y Fent, 1995). La sensibilidad, especificidad y precisión del

PALABRAS CLAVE / Biomarcadores / Comunidades Microbianas / Contaminación Química /

Recibido: 01/06/2006. Modificado: 21/11/2006. Aceptado: 27/11/2006.

Lorelei Bozo. Licenciada en Biología, Universidad Simón Bolívar (USB), Venezuela. Estudiante de Doctorado, USB, Venezuela. e-mail: lorelei.bozo@gmail.com

Milagro Fernández. Licenciada en Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela. Estudiante de Doctorado, USB, Venezuela. e-mail: milagrofernandez@gmail.com

Mariela López. Licenciada en Biología, USB, Venezuela. Estudiante de postgrado, USB, Venezuela. e-mail: marielixtica@yahoo.com

Rosa Reyes. Doctora en Ciencias Biológicas, USB, Venezuela. Profesora, USB, Venezuela. Dirección: Departamento de Biología de Organismos, USB, Caracas 89000, Venezuela. e-mail: rereyes@usb.ve

Paula Suárez. Doctora en Ciencias Biológicas, USB, Venezuela. Profesora, USB, Venezuela. e-mail: psuarez@usb.ve

biomarcador suelen disminuir al incrementar el nivel de organización, mientras que la relevancia ecológica aumenta (Adams *et al.*, 1989).

Dentro de la complejidad de los ecosistemas y sus respuestas a los contaminantes, las comunidades microbianas se caracterizan por utilizar la mayor parte de los compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía (Atlas y Bartha, 1998). Se han descrito ampliamente las interacciones que se establecen entre las bacterias y los metales pesados (Suárez y Reyes, 2002), así como el crecimiento de un importante grupo de microorganismos en presencia de materia orgánica (Alcamo, 2003). Debido a la importancia de las comunidades microbianas en el ciclo de nutrientes dentro de los ecosistemas y a la gravedad de la contaminación química imperante en el planeta y sus efectos sobre estas comunidades, se revisaron las principales respuestas de las comunidades microbianas a los contaminantes químicos. En este contexto se describen los principales tipos de biomarcadores de la contaminación, sus ventajas, desventajas y aplicaciones, así como las principales respuestas reseñadas en comunidades microbianas ante la contaminación por compuestos químicos tales como materia orgánica, metales pesados e hidrocarburos poliaromáticos.

Biomarcadores de la Contaminación

Se han sugerido varias definiciones para los biomarcadores. Un "biomarcador" es, en sentido amplio, una respuesta medida a cualquier nivel de organización biológica que puede estar relacionada con el impacto de los contaminantes (Melacon, 1995), a diferencia del término "bioindicador", que se refiere a aquellos organismos o comunidades en los que su existencia, sus características estructurales, su funcionamiento y sus reacciones dependen del medio en que se desarrollan y que cambian al modificar las condiciones ambientales (Capó, 2002). En base a estas definiciones, varios autores utilizan el término biomarcador para denotar las respuestas de los organismos en los niveles de organización inferiores al individuo (átomos, moléculas, célula, tejidos, órganos y sistemas) y el término bioindicador para designar las respuestas en los niveles de organismo, población, comunidad y ecosistema (Depledge *et al.*, 1995).

Ventajas del uso de los biomarcadores

Las ventajas de los biomarcadores para el monitoreo biológico han sido discutidas ampliamente en la literatura (Livingstone, 1993; Bucheli y Fent, 1995; Melacon, 1995; Capó, 2002; Suk y Wilson, 2002; de Acevedo y da Mata, 2003). Las dos características más importantes de los

biomarcadores son: 1) la identificación de las interacciones entre el contaminante y el organismo, y 2) la medición de efectos sub-letales. Por análisis químico solo puede medirse una fracción de los contaminantes presentes sin evidenciar los efectos adversos. Los biomarcadores, por su parte, indican la presencia de contaminantes tanto conocidos como no identificados. La sub-letalidad y detección de efectos tempranos conduce a acciones de prevención y/o remediación (Livingstone, 1993).

Las razones para monitorear las respuestas al impacto de la contaminación en los organismos, en oposición a los análisis químicos de contaminantes en agua o sedimento, son varias. Los biomarcadores: 1) Proveen una medida integrada de la biodisponibilidad de los contaminantes en el tiempo, en oposición a la situación ofrecida por el análisis químico, donde la información puede provenir de eventos raros o descargas intermitentes. 2) Son el reflejo de la exposición a contaminantes ambientales; así, la especificidad de las respuestas y la comprensión de los mecanismos involucrados permiten establecer su causalidad. 3) Pueden ayudar a establecer la importancia de diferentes rutas de exposición, contribuyendo así a fijar prioridades en el monitoreo y a sugerir estrategias para la intervención o remediación, debido a que tienen aplicación en especies de diferentes hábitats o de distintos niveles tróficos. 4) Los bioensayos de toxicidad pueden proveer información de las toxicidades relativas de químicos o efluentes específicos, pero la extrapolación a situaciones de campo es muy difícil por muchas razones que incluyen especiación química, efectos de absorción y entrada, acumulación en la cadena trófica, sub-letalidad y modos de acción del tóxico no detectables en pruebas a corto plazo. Otras ventajas del uso de los biomarcadores son: 5) La detección de la exposición y efectos tóxicos de compuestos parentales y metabolitos rápidamente metabolizables y eliminados, tales como hidrocarburos poliaromáticos y compuestos organofosforados. 6) La integración de interacciones de mezclas de contaminantes para rendir una expresión del efecto acumulativo a nivel molecular, celular o tisular. 7) El potencial de integración en los diferentes niveles de organización biológica puede predecir, a corto plazo, los efectos ecológicos que se producirán a largo plazo (Livingstone, 1993; Bucheli y Fent, 1995; Melacon, 1995; Capó, 2002; de Acevedo y da Mata, 2003).

Limitaciones en el uso de los biomarcadores

La aplicación de los biomarcadores está limitada por 1) cambios en las variables ambientales, 2) especificidad, 3) dosis-respuesta, 4) comprensión del mecanismo involucrado, y 5) experticia técnica y equipos adecuados para obtener e interpretar

los resultados (Livingstone, 1993; Bucheli y Fent, 1995).

Dependiendo del conjunto de contaminantes capaces de inducir la expresión de un determinado biomarcador, estos pueden clasificarse como biomarcadores generales, aquellos que se expresan en respuesta a un amplio rango de contaminantes, y biomarcadores específicos, aquellos que son inducidos por un contaminante en particular. Una importante limitación en su uso es que tanto los biomarcadores generales como los específicos pueden cambiar con las condiciones estacionales, reproductivas y otras variables ambientales (Depledge *et al.*, 1995; Knap *et al.*, 2002). La especificidad de un biomarcador se ha referido a diversos grupos de contaminantes, tales como metales pesados y ciertos compuestos orgánicos, desconociéndose para otros contaminantes. Las dosis-respuestas observadas pueden diferir entre el laboratorio y el campo. Esto es materia de atención si el énfasis está en utilizar el biomarcador como una medida biológica de los niveles de contaminación, en lugar de una medida integradora de los efectos de una mezcla de contaminantes en el organismo. La comprensión del mecanismo es necesaria para la interpretación y aplicación del biomarcador (Melacon, 1995), y se requieren mayores investigaciones para dilucidar estos mecanismos.

Aplicaciones de los biomarcadores

Los usos potenciales de los biomarcadores incluyen programas rutinarios de monitoreo a largo plazo, análisis de riesgo en sitios específicos de descarga, cumplimiento de estándares ambientales y seguimiento a las acciones de remediación, entre otros (Livingstone, 1993). Estos deben ser aplicados junto con otros tipos de mediciones, como parte de un programa de monitoreo bien diseñado que incluya el análisis químico de los contaminantes y el uso de biomarcadores generales y específicos. En aquellos casos en que el problema ambiental haya sido identificado, será posible desarrollar programas sencillos de monitoreo de rutina utilizando un mayor número de biomarcadores. El programa puede usar especies bioindicadoras que permitan el análisis de la salud del organismo como reflejo de la salud del ambiente (calidad del agua, por ejemplo) u otras especies que permitan el análisis del organismo mismo. Las características deseables en un bioindicador incluyen una amplia distribución geográfica, fácil recolección, estilo de vida sésil o de territorialidad restringida, y buena comprensión de los procesos bioquímicos del organismo (Cliver y Newman, 1987; Crowe *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2004). Una de las metas de los estudios de respuestas biológicas a los contaminantes es predecir cambios en la población y la comunidad, a partir de las alteraciones en los biomarcadores mole-

culares, celulares y fisiológicos (Windows y Donkin, 1991; Suk y Wilson, 2002). Varios autores (Depledge *et al.*, 1995; Crowe *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2004) han destacado la necesidad del uso de pruebas combinadas de biomarcadores en el laboratorio y el campo, a fin de extrapolar la información del laboratorio al ecosistema real y así predecir el potencial de los contaminantes. Con la aplicación de estas pruebas combinadas, es posible relacionar la extensión de las respuestas biológicas con el grado de deterioro ecológico en el ecosistema estudiado. Neuberger-Cywiak (2004), por su parte, propuso la utilización de los biomarcadores y bioindicadores como herramientas para ser utilizadas en evaluaciones de riesgo ecológico (ERE) y en evaluaciones de impacto ambiental (EIA).

Las comunidades microbianas pueden ser consideradas como bioindicadores de la presencia de contaminantes al analizar algunas de sus características bajo determinadas condiciones ambientales. El monitoreo de la calidad bacteriológica del agua mediante el uso del grupo de los coliformes es una herramienta necesaria para tomar decisiones sobre la idoneidad de un cuerpo de agua para el contacto humano ya sea directo o indirecto; del mismo modo, permite en caso de detectar la presencia de un problema, estimar la gravedad del mismo y facilitar la planificación de estrategias orientadas a su solución (Caruso *et al.*, 2002; Fujioka, 2002). La estimación de estos microorganismos indicadores mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) en aguas recreacionales marinas y estuarinas, ha probado ser útil como herramienta para evaluar la calidad del agua (Olson, 1978) y sigue figurando dentro de las técnicas aprobadas por la *American Public Health Association* para el control de este tipo de localidades (APHA, 1995). Por consiguiente, el uso de estos microorganismos como bioindicadores de contaminación fecal representa una herramienta de control sanitario y ambiental de los cuerpos de agua y de control epidemiológico de enfermedades infecciosas transmitidas por el agua.

Otros compuestos altamente tóxicos para los seres vivos son los metales pesados. La alta peligrosidad de estos compuestos se debe principalmente a su capacidad para ser acumulados en los organismos y ser transferidos en las cadenas tróficas, y a su tendencia a multiplicar su concentración desde un nivel trófico al siguiente (Nies, 1999; Sar *et al.*, 2001; de Acevedo, 2003; de Acevedo y da Mata, 2003). La relación contaminante-microorganismo origina una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresan como mecanismos de resistencia hacia el contaminante (Moraga *et al.*, 2003). Del mismo modo, las comunidades bacterianas expresan menor diversidad de especies nuevas en función de las cantidades de contaminantes presentes en su entorno. Hasta la fecha se han

realizado estudios con el fin de determinar el efecto de metales pesados sobre las comunidades microbianas y los mecanismos que éstas desarrollan a fin de mantenerse bajo condiciones adversas; sin embargo, los detalles de estos mecanismos continúan siendo tema de investigación en función de cada uno de los metales pesados (Ford *et al.*, 2005). La descarga continua de metales pesados genera presión selectiva sobre las comunidades microbianas en el ambiente, produciendo mutaciones que conllevan al desarrollo de nuevas especies bacterianas dentro de la comunidad, con genotipos capaces de sobrellevar el estrés. Investigaciones recientes proponen esta resistencia como una herramienta de monitoreo ante la presencia de estos contaminantes, promoviendo así el aislamiento de los genes relacionados como indicador de la presencia, cantidad y/o biodisponibilidad de metales en el ambiente (Ford *et al.*, 2005).

En países donde el petróleo es la principal fuente de energía y la base de la economía, es importante estudiar el destino de las sustancias que lo componen una vez descargadas a los ecosistemas, para así determinar su calidad ambiental. En este sentido, los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) son los componentes residuales más peligrosos en el procesamiento del petróleo, dado que por sus características estructurales y poca solubilidad tienden a ser persistentes en el ambiente. Además, estas sustancias presentan propiedades cancerígenas y mutagénicas, y su incorporación a la cadena alimenticia del ser humano puede provocar daños irreversibles (Mastandrea *et al.*, 2005). Los vertidos de los PAHs tienen un profundo impacto sobre la estructura de las comunidades microbianas naturales, el cual se suele traducir en una reducción de la diversidad, la biomasa y la actividad (Macnaughton *et al.*, 1999; Bundy *et al.*, 2002; Fahy *et al.*, 2005). Se ha observado que en ambientes sometidos a contaminación crónica por hidrocarburos, predominan poblaciones de microorganismos capaces de utilizar o sobrevivir en presencia de estos contaminantes. Sin embargo, bajo condiciones normales, dichos grupos de microorganismos están presentes en bajas concentraciones. Esta respuesta poblacional puede ser utilizada como herramienta de monitoreo de la calidad ambiental en relación con la contaminación por PAHs (Lizarraga-Partida *et al.*, 1991; Martínez-Alonso y Gaju, 2005).

Respuestas de los Microorganismos a la Contaminación Química

Los microorganismos se alimentan y metabolizan sustancias orgánicas, a partir de las cuales obtienen nutrientes y energía. Ciertos microorganismos pueden transformar sustancias orgánicas peligrosas para los seres humanos, como combustibles o solventes, descomponiéndolas en sustancias

menos tóxicas o inocuas, mineralizándolos a dióxido de carbono y agua. Una vez degradados los contaminantes, la población de microorganismos se reduce porque ha agotado su fuente de nutrientes (EPA, 1996).

Contaminación por materia orgánica

La materia orgánica se refiere a sustancias químicas basadas en cadenas de carbono e hidrógeno. En muchos casos contiene O₂, N₂, S, P, B y halógenos. Son sustancias que existen en la naturaleza asociadas a los seres vivos (Alcama, 2003). En el caso de la materia orgánica, las principales respuestas biológicas se han estudiado a nivel poblacional. En este sentido, se ha determinado que la adición de grandes cantidades de materia orgánica a los ambientes acuáticos produce la eutrofización de las aguas y el crecimiento masivo de algas (Prescott *et al.*, 2004). Asimismo, el vertido de aguas residuales, desechos domésticos, agropecuarios e industriales en los ecosistemas acuáticos afecta principalmente la estructura comunitaria, favorece la eutrofización y aumentan la demanda de oxígeno, estimulando el crecimiento de los microorganismos en grandes cantidades (Ford, 1993; Atlas y Bartha, 1998).

Con el incremento en el uso del agua, especialmente como receptor de los desechos generados por el hombre, los efectos de la materia orgánica y los patógenos son una preocupación constante para la salud pública (Prescott *et al.*, 2004). La necesidad de determinar cuándo un cuerpo de agua está contaminado con aguas servidas fue reconocida desde 1885, cuando Theodor von Escherich determinó que las bacterias coliformes eran numerosas y siempre se detectaban en heces y acueductos de aguas servidas (referido en Fujioka, 2002). Otros descubrimientos importantes (referidos en Fujioka, 2002) fueron los de Klein y Houston (1899), Scott (1932) y Stevenson (1953), los cuales condujeron a aceptar el nivel de coliformes como el mejor criterio de contaminación. La Agencia de Protección Ambiental y la Organización Mundial de la Salud han establecido patrones de calidad microbiológica del agua en términos de coliformes totales y coliformes fecales (WHO, 1993; USEPA, 1994). Estos son grupos de bacterias, excretadas por humanos y animales, que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y usualmente incluyen a *Escherichia coli* y varios miembros de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* (Toranzo y McFeters, 2002), clásicamente utilizados como marcadores de contaminación acuática por materia orgánica (Leclerc *et al.*, 2001). De esta manera, los coliformes totales, el subgrupo de los fecales y *E. coli* han sido utilizados como indicadores de calidad bacteriológica del agua durante más de un siglo (Mossel y Vega, 1973; EEC, 1980; Cliver y

Newman, 1987; APHA, 1995; WHO, 1996; Marshall *et al.*, 1997).

El uso de los coliformes para predecir la calidad del agua potable en su contenido de virus y protozoos ha sido cuestionado desde 1970 (Leclerc, 2003), debido a que los tiempos de supervivencia de esas bacterias entéricas son más cortos en el agua que los de otros microorganismos, a su mayor susceptibilidad a los procesos de tratamiento y al posible origen no entérico (McFeters *et al.*, 1974; Wun *et al.*, 1976; LeChevallier, 1990; APHA, 1995; Moe, 2002; Tallon *et al.*, 2005). Sin embargo, los coliformes continúan siendo reconocidos como indicadores aceptables de la eficacia de procesos de tratamiento y desinfección (FPTCDW, 2002; Tallon *et al.*, 2005).

Por lo expuesto, los coliformes se constituyen históricamente como los biomarcadores de contaminación de los ambientes acuáticos más ampliamente utilizados para evaluar la calidad bacteriológica del agua, en virtud de que sus densidades poblacionales incrementan significativamente con el aporte de materia orgánica en los cuerpos de agua.

Contaminación por metales pesados

Los metales pesados se definen en función de su naturaleza densa respecto a otros elementos ($\geq 5\text{gr}\cdot\text{l}^{-1}$). De los 90 elementos conocidos, 21 son no metales, 16 son metales ligeros y el resto son metales pesados (Nies, 1999). Hasta el momento se han determinado 53 metales que cumplen con esta característica, incluyendo Hg, Cd, As, Cr, Tl, Zn, Ni y Pb, entre otros (Goyer, 1991; Nies, 1999).

Algunos metales pesados como Cu, Se, y Zn han sido descritos como esenciales para mantener el metabolismo en los seres vivos. Sin embargo, para otros como Hg, Pb y Cd no se ha encontrado función biológica alguna (Goyer, 1991; Suárez y Reyes, 2002). A diferencia de los compuestos de origen orgánico, los metales pesados no pueden degradarse ni biológica ni químicamente; aún cuando los compuestos que tienen metales pueden alterarse, éstos permanecen en el ambiente moviéndose en los ciclos biogeoquímicos e incluso transformándose a compuestos más tóxicos y biodisponibles, tal como el caso del metil-mercurio (Reyes, 1999). Estas características hacen de estos elementos factores importantes en la contaminación química, debido a su alta toxicidad (Nies, 1999; Moraga *et al.*, 2003).

La importancia biológica de los metales pesados se deriva de su alta solubilidad bajo condiciones fisiológicas. Además, su alta toxicidad depende de la marcada afinidad de estos elementos por el azufre y los bioelementos de mayor tamaño en las células (Nies, 1999; Goyer, 1991; de Acedo, 2003). A diferencia de los mamíferos y plantas, los

microorganismos son capaces de desarrollar estrategias metabólicas que le confieren una alta capacidad adaptativa ante la presencia de metales pesados, así como resistencia a los mismos en función de la exposición a estos contaminantes en el medio (Ford y Ryan, 1995; Ford *et al.*, 1998; Moraga *et al.*, 2003). La microbiología de los metales pesados ha sido ampliamente estudiada debido a la gran cantidad de estrategias adaptativas que han desarrollado los microorganismos ante la presencia de estos contaminantes. Se han descrito las interacciones bacteria-contaminante, identificadas con respecto al lugar donde se llevan a cabo, bien sea a nivel intracelular, extracelular ó en la superficie bacteriana (Suárez y Reyes, 2002).

Los efectos de los metales tóxicos sobre los microorganismos se evidencian en la viabilidad, morfología, crecimiento y metabolismo de las células afectadas (Ford, 1994). A este respecto, una de las respuestas generalmente reseñadas en los microorganismos ante los metales pesados es la presencia de proteínas ricas en el aminoácido cisteína, con el cual son capaces de unir los metales a su estructura molecular y retirarlos del medio intracelular. Estas proteínas son conocidas como metalotioninas y han sido descritas en todos los organismos vivos (Hammer, 1986; Roesijadi, 1992; García y Reyes, 1996, 1998, 2001; Reyes, 1999; Salazar y Reyes, 2000; Reyes *et al.*, 2001). Se han descrito situaciones donde la presencia de un metal pesado en el medio ejerce una fuerte presión de selección sobre los microorganismos que allí habitan. Asimismo, un incremento en su concentración puede ejercer una presión selectiva capaz de modificar la microbiota del ecosistema contaminado (Ford, 1994; Moraga *et al.*, 2003). Debido a la alta tasa reproductiva que caracteriza a los microorganismos, este tipo de cambio se hace evidente con mayor rapidez que en organismos de mayor complejidad, proporcionando así una herramienta de respuesta rápida a las alteraciones del medio en presencia de este tipo de contaminantes.

Contaminación por hidrocarburos poliaromáticos (PAHs)

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos o poliaromáticos (PAHs) constituyen un grupo de más de 200 compuestos químicos formados por dos o más anillos aromáticos unidos en arreglos angulares, lineales o agrupados, cuya biodegradabilidad disminuye a medida que aumenta el número de anillos (Johnsen *et al.*, 2005). Estos compuestos pueden dividirse en dos grupos según su peso molecular: los de bajo peso molecular formados por los PAHs de dos a tres anillos, y los de alto peso molecular formados por aquellos que contienen en su estructura más de tres anillos. Los PAHs de bajo peso molecular son susceptibles a biorremediación, sin embargo,

los de alto peso molecular son recalcitrantes a la degradación biológica (Moreno, 2003; Valderrama, 2004).

Los hidrocarburos poliaromáticos se forman naturalmente en el curso de algunas reacciones geológicas y la fosilización de plantas, o antropogénicamente en las industrias de petróleo, producción de gas, procesos siderúrgicos y preservación de madera (Valderrama, 2004). Los PAHs son contaminantes únicos en el ambiente porque son generados continua e inadvertidamente por la combustión incompleta de la materia orgánica (carbón, gasolina, petróleo, tabaco y madera), incendios forestales, motores de combustión e incineración de desechos (Johnsen *et al.*, 2005). Las investigaciones más recientes reseñan a los PAHs y sus derivados como los responsables del incremento en la incidencia de diversos tipos de cáncer en el ser humano (Mastandrea *et al.*, 2005). Los PAHs constituyen del 10 al 25% del petróleo crudo, siendo las fracciones más pesadas, de mayor toxicidad y al mismo tiempo de mayor persistencia en la naturaleza. Las tasas de degradación de PAHs son variables y dependen de su estructura y de los parámetros fisicoquímicos, así como del sitio, número y variedad de microorganismos presentes (Valderrama, 2004). Los PAHs suelen depositarse en sedimentos y suelos en pequeñas concentraciones debido a su baja solubilidad en agua. Históricamente, para la mayoría de PAHs la toxicidad en agua no ha sido un gran problema, excepto para aquellos más solubles y de dos anillos, particularmente tóxicos, como el naftaleno. Sin embargo, estudios recientes han indicado que algunos PAHs pesados pueden mostrar toxicidad en aguas a niveles bajos de solubilidad debido a la acción de luz ultravioleta o a otros factores que favorecen la toxicidad fotoinducida (Johnsen *et al.*, 2005).

Una respuesta frecuentemente detectada, con respecto a la incorporación de los hidrocarburos al ambiente, es la disminución o el aumento de la población microbiana (Kelly y Tate, 1998; Kelly *et al.*, 2003). Esto depende de la composición química de los hidrocarburos y de las especies de microorganismos presentes en dicho ambiente. En el ecosistema se produce un aumento de los microorganismos que emplean hidrocarburos como fuente de carbono y/o de energía y una disminución de los microorganismos autóctonos del lugar, ya que los hidrocarburos son tóxicos para éstos, generando una inhibición de su crecimiento (Atlas y Bartha, 1998; Rajendren *et al.*, 1995; Ringelberg *et al.*, 2001). Las comunidades microbianas en ecosistemas contaminados tienden a ser dominadas por aquellos organismos capaces de utilizar y/o sobrevivir a los compuestos tóxicos. Como resultado, estas comunidades son menos diversas que aquellos sistemas de referencia no contaminados, aunque la diversidad también puede estar influenciada por la com-

plejidad de la mezcla de compuestos presentes y por el tiempo que las poblaciones han estado expuestas (Valderrama, 2004).

Cabe destacar que la capacidad de biotransformación de los PAHs es un mecanismo muy difundido y frecuente en muchos tipos de organismos que recurren a una serie de enzimas que catalizan reacciones de conjugación (sulfotransferasa, epóxido-hidrolasa, glutatión-S-transferasa y UDP-glicotransferasa). Estos sistemas enzimáticos están distribuidos en todos los tejidos de los organismos estudiados. Las monoxigenasas dependientes del citocromo P-450 (CYP1A) son responsables de la oxidación enzimática de los PAHs. Ellas actúan sobre una zona de densidad electrónica elevada a nivel de la región angular de la molécula de los PAHs, generando epóxidos que pueden formar fenoles espontáneamente, o por acción de las epóxido-hidrolasas pueden producir dihidrodioles (Livingstone, 1993; Pothuluri *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Mastandrea *et al.*, 2005). Recientemente, los potenciales de las enzimas asociadas a estos sistemas en bacterias han sido evaluados con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias en la biorremediación ambiental, ya que dichas enzimas son relativamente estables, altamente activas y pueden ser preparadas en grandes cantidades mediante sistemas de expresión recombinante. Se están diseñando proteínas relacionadas con el citocromo P-450 que posean actividades dirigidas a la oxidación de los PAHs, las cuales podrían ser utilizadas como un método alternativo para el monitoreo de estos contaminantes (Li *et al.*, 2001).

AGRADECIMIENTOS

Las autoras quieren agradecer a Lya Neuberger por la lectura crítica del manuscrito y sus sugerencias, y al Programa de Promoción al Investigador por su ayuda financiera.

REFERENCIAS

- Adams S, Shepard K, Greeley M, Jiménez B, Ryon M, Shugart L, McCarty J (1989) The use of bio-indicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Env. Res.* 28: 459-464.
- Alcama I (2003) *Microbes and Society. An introduction to Microbiology.* Jones and Bartlett. Boston, MA, EEUU. 443 pp.
- APHA (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 19th ed. American Public Health Association. Washington, DC, EEUU. 112 pp.
- Atlas R, Bartha R (1998) *Microbial Ecology: Fundamentals and applications.* Benjamin/Cummings. Nueva York, NY, EEUU. 318 pp.
- Bucheli T, Fent K (1995) Induction of cytochrome P-450 as a biomarker for environmental contamination. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 25: 201-268.
- Bundy JG, Paton GI, Campbell CD (2002) Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.* 92: 276-288.
- Capó M (2002) *Principios de Ecotoxicología.* McGraw Hill. Madrid, España. 314 pp.
- Caruso G, Crisafi E, Mancuso M (2002) Development of an enzyme assay for rapid assessment of *Escherichia coli* in seawaters. *J. Appl. Microbiol.* 93: 548-556.
- Clover DO, Newman RA (1987) Special issue. Drinking water microbiology. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 7: 115-201.
- Crowe T, Smith E, Donkin P, Barnaby D, Rowland S (2004) Measurements of sublethal effects on individual organisms indicate community-level impacts of pollution. *J. Appl. Ecol.* 41: 114-123.
- de Acevedo F (2003) *Toxicología do Mercúrio.* RiMa. São Paulo, Brasil. 292 pp.
- de Acevedo F, da Mata A (2003) *As bases toxicológicas da Ecotoxicologia.* RiMa. São Paulo, Brasil. 340 pp.
- Depledge M, Aagaard A, Gyorkos P (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioral biomarkers. *Mar. Pollut. Bull.* 21: 19-27.
- EPA (1996) *Guía del ciudadano: Medidas biocorrectivas.* EPA 542-F-96-023. Agencia para la Protección del Medio Ambiente. Washington, DC, EEUU. pp 1-4.
- EEC (1980) Council directive relating to the quality of water intended for human consumption (80/778/ European Economic Community). *Off. J. Eur. Commun. L229:* 11-29.
- Fahy A, Lethbridge G, Earle R, Ball A, Timmis K, McGenity T (2005) Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environ. Microbiol.* 7: 1192-1199.
- FPTCDW (2002) *Bacteriological Quality. Guidelines for Canadian drinking water quality - Supporting documentation.* Federal Provincial Territorial Committee on Drinking Water. Ottawa, Canadá. 17 pp.
- Ford T (1993) *Aquatic Microbiology. An Ecological Approach.* Blackwell. Nueva York, NY, EEUU. pp. 468-469.
- Ford T (1994) Pollutant Effects on the Microbial Ecosystems. *Env. Health Persp.* 102: 3-8.
- Ford T, Ryan D (1995) Toxic Metals in Aquatic Ecosystems: a Microbiological Perspective. *Env. Health Persp.* 103: 25-38.
- Ford T, Sorci RI, Shine J (1998) Interaction between Metals and Microbial Communities in New Bedford Harbor, Massachusetts. *Env. Health Persp.* 106: 1033-9.
- Ford T, Jay J, Patel A, Promasith P, Galloway T, Sanger R, Smith K, Depledge M (2005) Use of Ecotoxicological tools to evaluate the health of New Harbor sediments: A Microbial Biomarker. *Env. Health Persp.* 113: 186-191.
- Fujioka R (2002) Indicators of marine recreational water quality. En Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology.* 2^{da} ed. ASM. Washington, DC, EEUU. pp: 234-243.
- García E, Reyes R (1996) Bioconcentration of mercury in *Acetabularia calyculus*: Evidence of a polypeptide in whole cells and anucleated cells. *Toxicol. Env. Chem.* 55: 11-18.
- García E, Reyes R (1998) Induction of mercury-binding peptide in whole cells and anucleated cells of *Acetabularia calyculus*. *Toxicol. Env. Chem.* 67: 189-196.
- García E, Reyes R (2001) Synthesis pattern of an Hg-binding protein in *Acetabularia calyculus* during short-term exposure to mercury. *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 66: 357-364.
- Goyer R (1991) *Toxic effect of metals.* Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poison. Pergamon. Washington, DC, EEUU. 1033 pp.
- Hammer D (1986) Metallothioneins. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- Johnsen A, Wick L, Harms H (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Env. Pollut.* 133: 71-84.
- Kelly JJ, Tate RL (1998) Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter. *J. Env. Qual.* 27: 609-617.
- Kelly JJ, Haggblom M, Tate RL (2003) Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles. *Biol. Fert. Soils* 38: 65-71.
- Knap A, Dewailly E, Furgal C, Galvin J, Baden D, Bowen RE, Depledge M, Duguay L, Fleming LE, Ford T, Moser F, Owen R, Suk WA, Unluata U (2002) Indicators of ocean health and human health: developing a research and monitoring framework. *Env. Health Persp.* 110: 839-45.
- LeChevallier MW (1990) Coliform regrowth in drinking water: a review. *J. Am. Water Works Assoc.* 82: 74-86.
- Leclerc H (2003) Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking-water. En World Health Organization (Ed.) *Heterotrophic Plate Counts and drinking-water safety.* IWA. Londres, RU. 420 pp.
- Leclerc H, Mossel D, Edberg S, Struijk C (2001) Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 201-234.
- Li Q, Ogawa J, Schmid R, Shimizu S (2001) Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 5735-5739.
- Livingstone D (1993) Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 57: 195-211.
- Lizarraga-Partida ML, Izquierdo-Vicuña FB, Wong-Chang I (1991) Marine bacteria on the Campeche Bank Oil Field. *Mar. Pollut. Bull.* 22: 401-405.
- Macnaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ, White DC (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 3566-3574.
- Marshall M, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling C (1997) Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 67-85.
- Martínez-Alonso M, Gaju N (2005) El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas.* Rev. Tecn. Cient. Ecol. Medio Amb. pp 1-12. www.revistaeosistemas.net.
- Mastandrea C, Chichizola C, Luduena B, Sánchez H, Álvarez H, Gutiérrez A (2005) Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 39: 27-36.
- McFeters G, Bissonnette G, Jezeski J, Thompson C, Stewart D (1974) Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.* 27: 823-829.
- Melacon M (1995) *Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. Handbook of Ecotoxicology.* Lewis. Boca Raton, FL, EEUU. 755 pp.
- Moe C (2002) Waterborne transmission of infectious agents. En Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology.* ASM. Washington, DC, EEUU. pp 184-204.
- Moore M, Depledge M, Readman J, Leonard D (2004) An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 552: 247-268.

- Moraga R, Merino C, Mondaca MA (2003) Resistencia a metales pesados en la Bahía de Iquique. *Invest. Marinas* 31: 91-95.
- Moreno D (2003) *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. McGraw Hill. Madrid, España. 370 pp.
- Mossel D, Vega C (1973) The direct enumeration of *Escherichia coli* in water using MacConkey's agar at 44°C in plastic pouches. *Health Lab. Sci.* 10: 303-307.
- Neuberger-Cywiak L (2004) *La ecotoxicología como herramientas en las Evaluaciones de Riesgo Ecológico y en las Evaluaciones de Impacto Ambiental*. Ponencia presentada en el 6to. Congreso Ibérico y 3ro. Iberoamericano de Contaminación y Toxicología Ambiental (CICTA-2005). Cádiz, España.
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 730-750.
- Olson B (1978) Enhanced accuracy of coliform testing in seawater by a modification of the Most Probable Number method. *Appl. Env. Microbiol.* 36: 438-444.
- Pothuluri J, Sutherland J, Freeman J, Cerniglia C (1998) Fungal biotransformation of 6-nitrochrysene. *Appl. Env. Microbiol.* 104: 3106-3109.
- Prescott L, Harley J, Klein D (2004) *Microbiología*. McGraw-Hill. Madrid, España. 1238 pp.
- Rajendran N, Matsuda O, Imamura N, Urushigawa Y (1995) Microbial Community structure analysis of euxinic sediments using phospholipid fatty acid biomarkers. *J. Oceanogr.* 51: 21-38.
- Reyes R (1999) Las metalotioninas como biomarcadores de la contaminación ambiental por metales pesados en organismos acuáticos. *Interciencia* 24: 366-371.
- Reyes R, Salazar R, García E (2001) Incorporation of cadmium by *Acetabularia calyculus*. *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 67: 749-755.
- Ringelberg DB, Talley JW, Perkins EJ, Tucker SG, Luthy RG, Bower EJ, Fredrickson HL (2001) Succession of phenotypic, genotypic, and metabolic community characteristics during *in vitro* bioslurry treatment of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 1542-1550.
- Roesijadi G (1992) Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22: 81-114.
- Salazar R, Reyes R (2000) Efectos tóxicos y mecanismos de tolerancia al cadmio en los seres vivos. *Univ. Cienc. Tecnol.* 13: 17-22.
- Sar P, Kazy SK, Singh SP (2001) Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature. *Appl. Microbiol.* 32: 257-261.
- Suárez P, Reyes R (2002) La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia* 27: 160-164.
- Suk WA, Wilson SH (2002) Overview and future of molecular biomarkers of exposure and early disease in environmental health. En Suk WA, Wilson SH (Eds.) *Biomarkers of Environmentally Associated Disease: Technologies, Concepts, and Perspectives*. CRC. Washington, DC, EEUU. 368 pp.
- Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Tin Leung K (2005) Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water Air Soil Pollut.* 166: 139-166.
- Toranzos GA, McFeeters GA (2002) Detection of Indicator Microorganisms in Environmental Fresh and Drinking Waters. En Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology*. ASM. Washington, DC, EEUU. pp. 205-219.
- USEPA (1994) *National Primary Drinking Water Standards*. EPA 810-F-94-001A. US Environmental Protection Agency. Washington, DC, EEUU. 198 pp.
- Valderrama B (2004) Microbiología del petróleo y sus derivados. En Martínez E, Martínez JC (Eds.) *Microbios en línea*. Universidad Nacional Autónoma de México. biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios
- WHO (1993) *Recommendations. Guidelines for drinking-water quality*. Vol. 1. 2ª ed. World Health Organization. Ginebra, Suiza. 212 pp.
- WHO (1996) *Health criteria and other supporting information. Guidelines for drinking water quality*. World Health Organization. Ginebra, Suiza. 201 pp.
- Windows J, Donkin P (1991) Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 69-75.
- Wun C, Walker R, Litsky W (1976) The use of XAD-2 resin for the analysis of coprostanol in water. *Water Res.* 10: 955-959.

BIOMARKERS OF CHEMICAL POLLUTION IN MICROBIAL COMMUNITIES

Lorelei Bozo, Milagro Fernández, Mariela López, Rosa Reyes and Paula Suárez

SUMMARY

The effects of toxic substances on an ecosystem begin with a biochemical reaction in the individual. The initial reactions start at the lowest levels of biological organization, are highly specific and reversible. Subsequently, with increments of impact, a sequence of alterations occurs at more complex levels leading to interference of vital functions and death. Biomarkers can be defined at any level of biological organization. At the higher organizational level the response sensitivity, specificity and accuracy usually decrease, but at the same time the ecological relevance of the biomarker increases. The main reactions of microorganisms to chemical pollutants were revised in view of the relevance of microbial communities within

the ecosystems and the severity of the current chemical contamination. This work describes the different kinds of biomarkers, their advantages, disadvantages and applications, as well as the main reactions of microbial communities to the presence of chemical and toxic compounds. It is concluded that the microbial communities are important bioindicators of water contamination by organic matter. The synthesis of methallothioneins may be regarded as an early sign of alarm in the initial stage of contamination due to heavy metals. The capacity of microbial communities to use certain polycyclic aromatic hydrocarbons as a source of energy and carbon, allow their use as bioremediation tools in oil and other organic compound spills.

BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO QUÍMICA EM COMUNIDADES MICROBIANAS

Lorelei Bozo, Milagro Fernández, Mariela López, Rosa Reyes e Paula Suárez

RESUMO

Os efeitos de substâncias tóxicas sobre um ecossistema se iniciam com uma reação bioquímica no indivíduo, resposta inicial que ocorre aos níveis de organização biológica mais baixa, é reversível e específica. Subsequentemente, com o incremento do impacto, tem lugar uma seqüência de alterações em níveis de organização mais complexos, com perturbação de funções vitais e morte. Os bio marcadores podem ser definidos a qualquer nível de organização biológica. Ao maior nível de organização a sensibilidade, especificidade e precisão das respostas costumam diminuir, enquanto que a relevância ecológica aumenta. Devida a importância das comunidades microbianas para a homeostase dos ecossistemas e a gravidade da contaminação química atual, se revisam as principais respostas das comunidades microbianas aos contami-

nantes químicos. Resenam-se os principais tipos de biomarcadores de contaminação, suas vantagens, desvantagens e aplicações, assim como as respostas mais usuais observadas em comunidades microbianas frente à contaminação química. Conclui-se que as comunidades microbianas são importantes bioindicadores da contaminação de águas por matéria orgânica, evidenciado pelo incremento populacional em resposta a estes contaminantes. Igualmente, a indução da síntese de metalotioninas pode considerar-se como um sinal de alarme precoce diante da contaminação por metais pesados. Finalmente, a capacidade de comunidades microbianas para utilizar certos compostos poliaromáticos como fonte de energia e carbono, permite sua utilização como ferramenta de bio-remediação diante de derrames de petróleo e outros compostos orgânicos.