

# **Biotecnología del Petróleo**

## **Parte A: Microbiología Básica**

**Unidad 1: Los Microorganismos- La célula- Genética- Enzimas. Crecimiento, Nutrición de los microorganismos- Ciclos metabólicos de interés**

**Unidad 2: Microorganismos y su ambiente. Cinética enzimática y microbiana**

**Unidad 3: Mecanismos del transporte y reactores**

**Mgter Ing. José Antonio Gálvez**



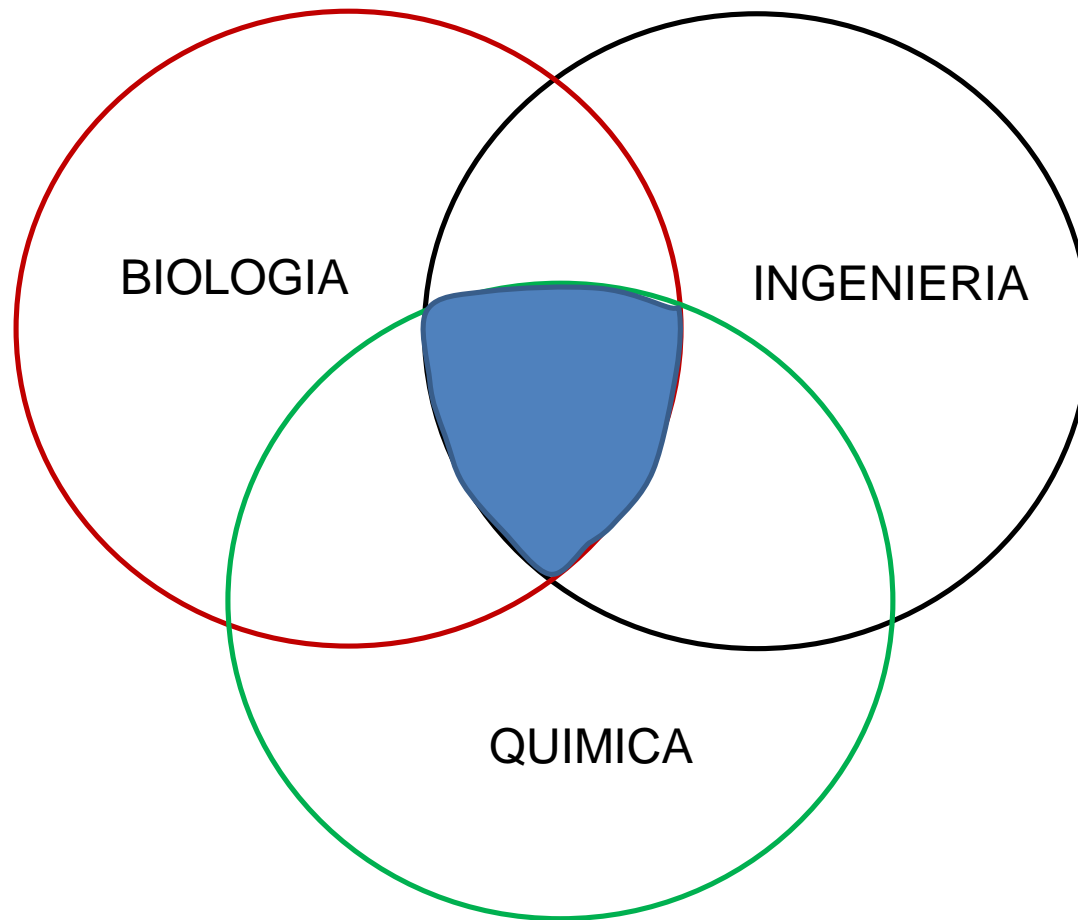
•La Biotecnología usa los sistemas biológicos para la producción de materiales y compuestos útiles para el hombre sin incluir animales íntegros o plantas que corresponden a otras áreas de la ingeniería.

Los sistemas biológicos son seres vivos o productos moleculares desarrollados por ellos. Los seres vivos incluyen microorganismos, células vegetales o animales, algas y un grupo especial de vegetales.

Los productos metabólicos se conocen con el nombre de enzimas.

Todos actúan como catalizadores de una reacción en donde se produce una transformación de una sustancia en otra.





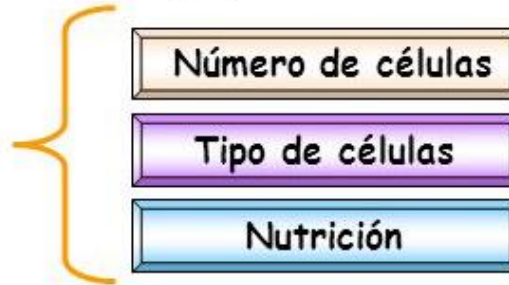
**Es una de las ciencias más antiguas que conoce el ser humano.**









# Reinos de los seres vivos

- Existen seis reinos que agrupan toda la diversidad de organismos sobre la Tierra.

- Criterios para diferenciar los reinos



Reinos	Archaea	Monera	Protista	Fungi	Plantae	Animalia
						
Número de células	Unicelular	Unicelular	Unicelular/ Pluricelular	Unicelular/ Pluricelular	Pluricelular	Pluricelular
Tipo de células	Procariotas	Procariotas	Eucariotas	Eucariotas	Eucariotas	Eucariotas
Nutrición	Autótrofa	Autótrofa	Autótrofa/ Heterótrofa	Heterótrofa	Autótrofa	Heterótrofa

- **La biotecnología permiten obtener una gran variedad de productos:**

### **Comodities:**

- **Enzimas industriales se usan ampliamente para catalizar reacciones químicas: producción de quesos, alimentos, limpieza, etc.**
- **Biocombustibles y bioenergía: bioetanol, aceites para producción de biodiesel, biogas, biohidrógeno.**
- **Productos químicos que pueden ser obtenidos por vía biológica: acetona, butanol, 2-3 butano diol, ácidos cítrico, glucónico, itacónico, succínico, málico, fumárico, láctico, acético, propiónico, acrílico, etc**
- **Biomateriales**



- **Productos para la salud: Productos farmacéuticos, Antibióticos, vacunas, químicos específicos, aminoácidos, enzimas, productos recombinantes, etc.**
- **Ingredientes para alimentos y producción de alimentos**
- **Productos para agricultura: biofertilizantes, biopesticidas, agentes para control biológico de plagas, plantas transgénicas, animales transgénicos**
- **Usos ambientales: degradación de compuesto tóxicos e industriales, residuos municipales, residuos cloacales. Tratamiento de residuos para agricultura, industria forestal y procesamiento de alimentos**
- **Usos mineros: biolixiviación,**
- **Usos petroleros: Exclusión biocompetitiva, tratamiento de aguas de inyección, Recuperación terciaria asistida por microorganismos (MEOR)**



## Herramientas:

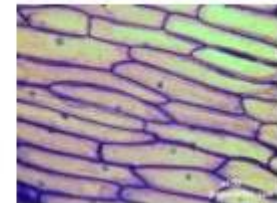
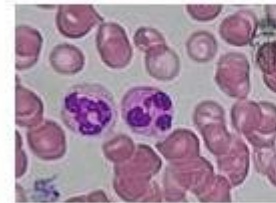
### Microorganismos

- Naturales
- Adaptados
- Modificado por ingeniería genética



ANIMALES

VEGETALES



## Tejidos vegetales y animales

## Plantas y animales naturales

## Plantas y animales modificados por ingeniería genética (llamados transgénicos)



## Microorganismos

### Participación en el ciclo de la materia

Los microorganismos tienen una importante función en la vida en la tierra ya que son los encargados de mineralizar el carbono que, a través de las plantas verdes, ha pasado a formar parte de compuestos orgánicos y se ocupan de mantener un delicado equilibrio.

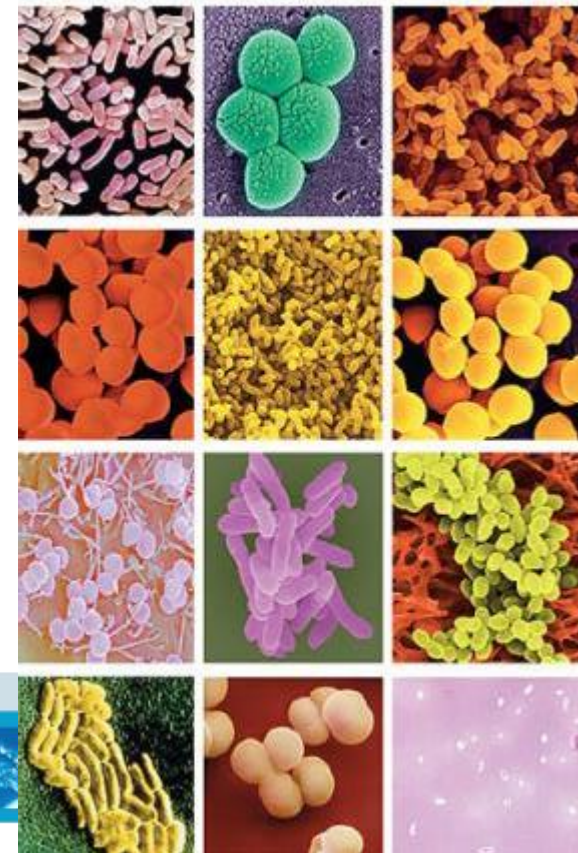
### Características generales:

Tamaño muy pequeño de los individuos. El diámetro de la mayoría de las bacteria no es superior a un micrón (milésima de milímetro,  $1 \cdot 10^{-6}$  metros). Los componentes internos se miden en nanómetros.

**elevada superficie específica.** Esta elevada relación superficie / volumen trae aparejado un alto *intercambio de materia*.

Elevada **flexibilidad fisiológica**, Encontramos microorganismos en todos lados,

Gran cantidad de microorganismos en poco espacio: en un suelo o en un cultivo líquido podemos hallar poblaciones de  $10^8$  hasta  $10^{10}$  células por gramo





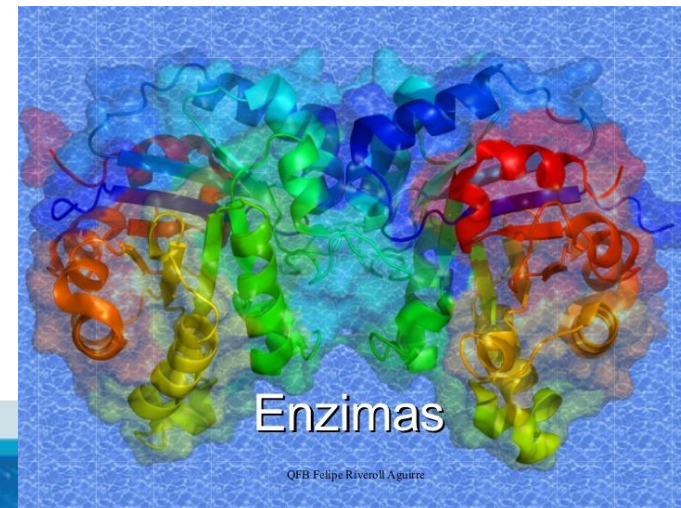
## Los microorganismos:

- Son medianamente predecibles
- Son medianamente controlables
- No está dicha la última palabra sobre su capacidad de afectar compuestos orgánicos o inorgánicos



## Las enzimas:

- Son predecibles pero pueden sufrir inhibiciones
- Son lábiles y muy reactivas



**ACHROMOBACTER**  
**ACTINOMYCES**  
**ALCALIGENES**  
**BACILLUS**  
**CORYNEFORMS**  
**ERWINIA**  
**FLAVOBACTERIUM**  
**LACTOBACILLUS**  
**NOCARDIA**  
**PECTOCOCCUS**  
**PSEUDOMONAS**  
**SARCINA**  
**SPIRILLUM**  
**STREPTOMYCES**  
**VIBRIO**  
**XANTHOMYCES**

# **bacterias**

---

**Fuente: PETROLEUM  
MICROBIOLOGY,  
R.M. ATLAS,  
MACMILLAN PUBLISHING CO, 1984**





Botella 3 Dilución 8

Botella 1 Dilución 8

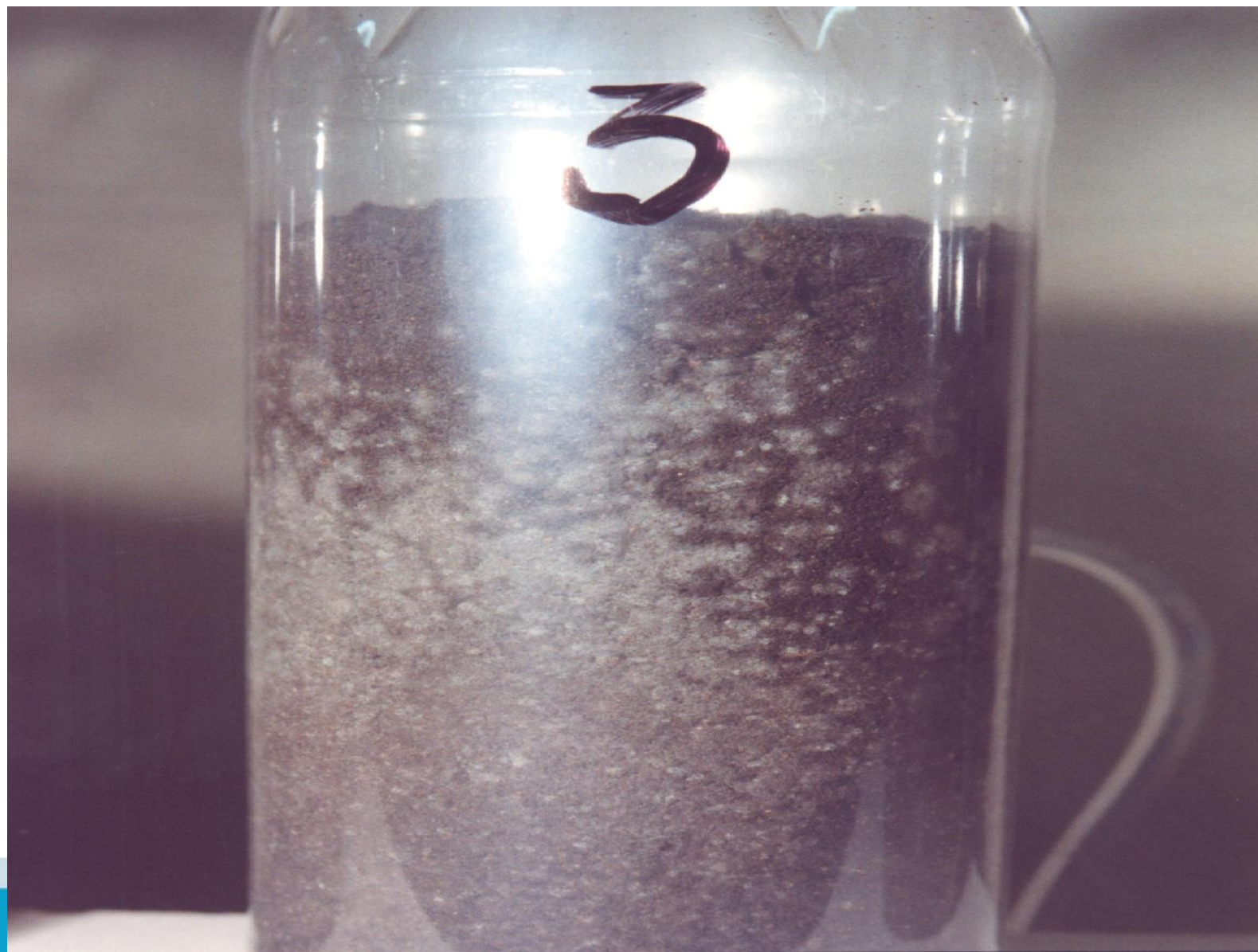
**ASPERGILLUS**  
**BOTRYTIS**  
**CANDIDA**  
**CLADOSPORIUM**  
**FUSARIUM**  
**HANSENULA**  
**OIDIODENDRUM**  
**PENICILIUM**  
**PAECYLOMYCES**  
**SACCHAROMYCES**  
**RHODOTORULA**  
**TORULOPSIS**  
**TRICHODERMA**  
**SACCHAROMYCOPSIS**  
**RHODOSPORIDIUM**

# **hongos**

---

**Fuente: PETROLEUM  
MICROBIOLOGY,  
R.M. ATLAS,  
MACMILLAN PUBLISHING CO,  
1984**





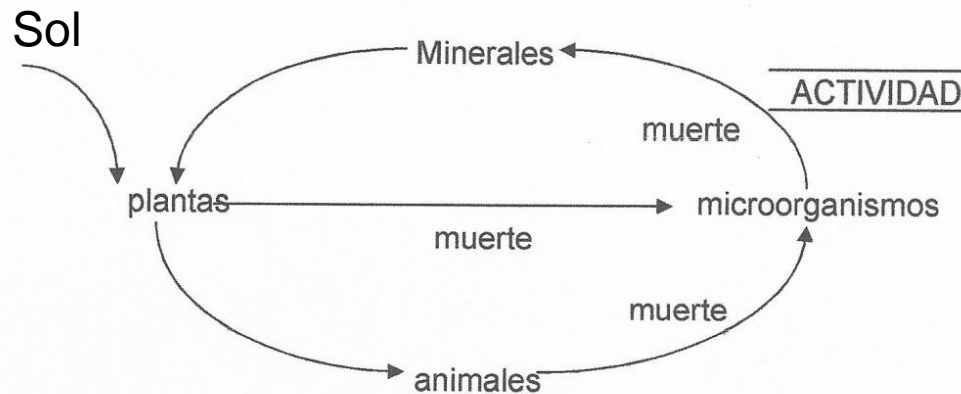


**x PARTICIPACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS CICLOS VITALES DE LA BIOSFERA**

- BIOSFERA {
- océanos
  - hasta uno o dos m. de espesor continental
  - hasta 10000 m. de atmósfera

- ⊕ la materia viva es la causante de los mayores cambios geoquímicos
- ⊕ la fuente de energía de estos cambios es el SOL
- ⊕ la energía solar es captada por la fotosíntesis
- ⊕ los organismos fotosintéticos sintetizan sus componentes orgánicos a partir de compuestos inorgánicos, CO<sub>2</sub> y agua (AUTÓTROFOS) que participan en el:

**x CICLO DE MINERALIZACIÓN-DESMINERALIZACIÓN**



Aunque la mineralización puede realizarse de tres formas:

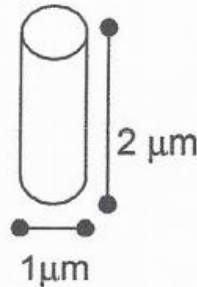
- ⊕ combustión
- ⊕ actividad respiratoria de los organismos superiores
- ⊕ acción de los microorganismos

los microorganismos son los de acción más importante en la biosfera.  
¡80% de su OXÍGENO y 90% de su CO<sub>2</sub> provienen de esta actividad!

**Razones**

1. DISTRIBUCIÓN: 1 Ha de tierra fértil de 15 cm. de espesor contiene 3.000 kg. de microorganismos = 50.000 personas.
2. CAPACIDAD METABÓLICA POR UNIDAD DE PESO:

BACTERIA  
 $\delta = 1 \text{ g/cm}^3$



$$R_{SP} ]_B = 5000 \text{ m}^2/\text{kg}$$

$$R_{SP} ]_{\text{HOMBRE}} = 2.4 \text{ m}^2 / 80 \text{ kg} = 0.03 \text{ m}^2/\text{kg}$$

167000 veces inferior

3. TIEMPO DE GENERACIÓN  $\theta$  (o duplicación de masa)

⊕ bacterias y levaduras	_____	10 a 120 min
⊕ bacterias anaeróbicas	_____	1 a 5 días
⊕ hongos y algas	_____	2 a 6 horas
⊕ pasturas	_____	1 a 2 semanas
⊕ pollos	_____	2 a 4 semanas
⊕ ganado	_____	1 a 2 meses
⊕ hombre	_____	0.2 a 0.5 años

¡Una bacteria con  $\theta = 20$  minutos tardaría 24 horas en alcanzar una masa equivalente a la de la Tierra!

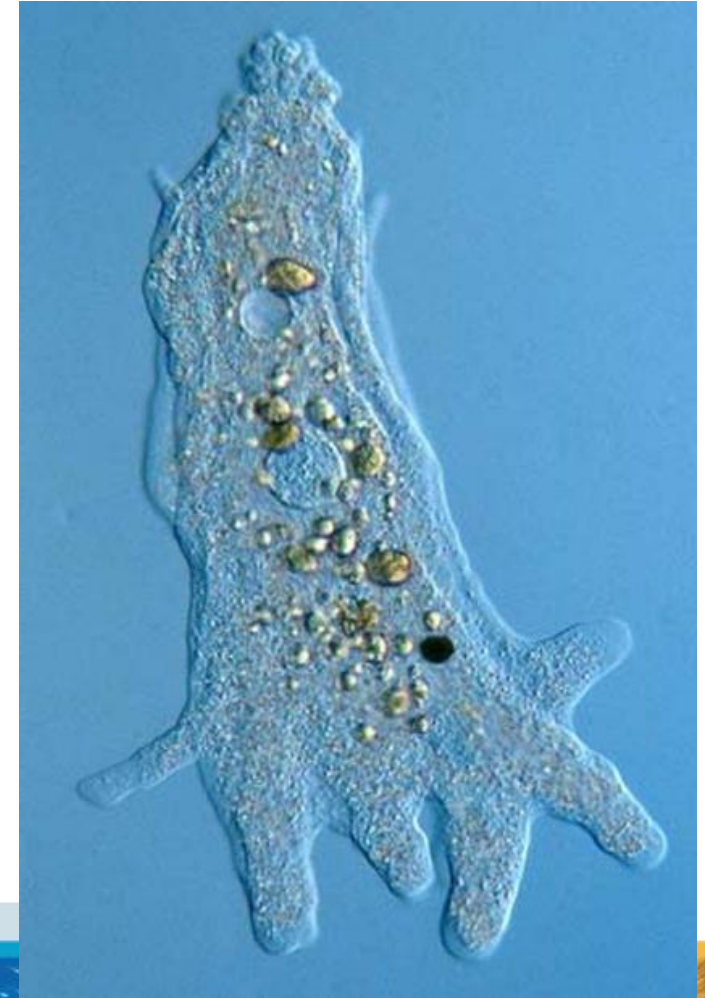


# LA CÉLULA Y SU ESTRUCTURA

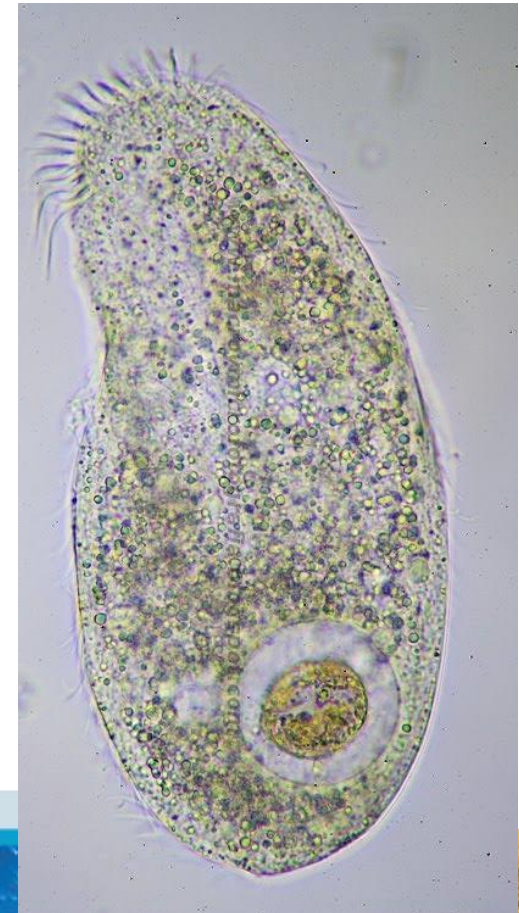
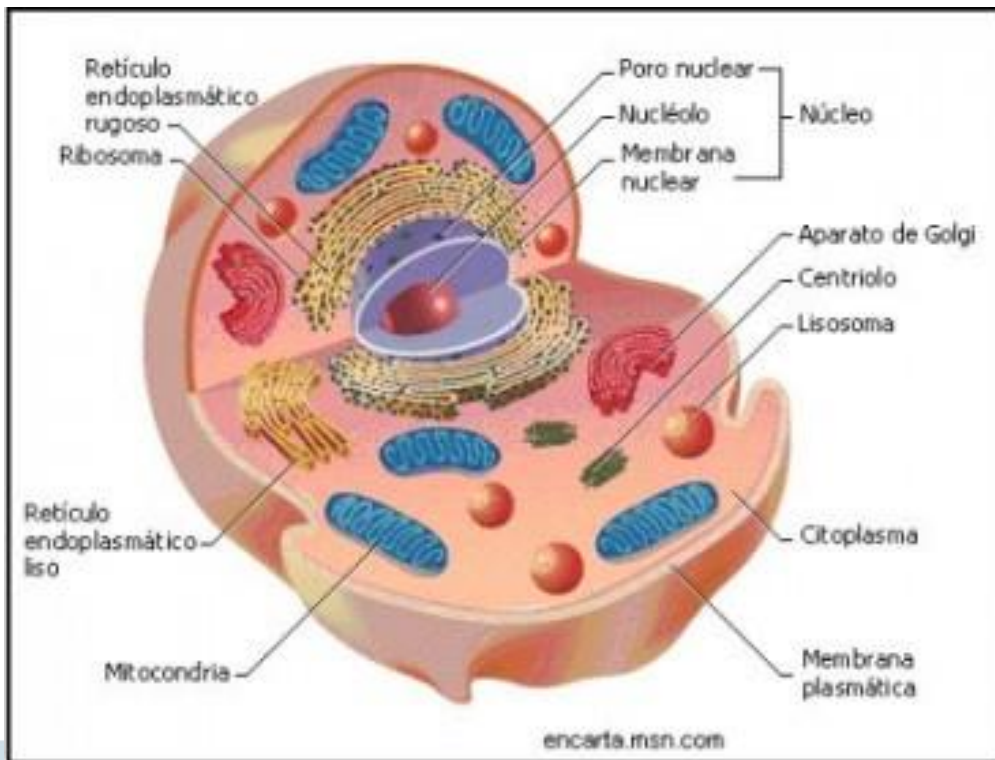
Todos los seres vivos presentan en común un conjunto de sustancias que componen sus piezas básicas, que son el ácido desoxirribonucleico (DNA), el ácido ribonucleico (RNA) y las proteínas.

La unidad física básica es la célula que a grandes rasgos podemos decir que está formada por una membrana exterior, un citoplasma y un núcleo que puede o no estar rodeado por una membrana. En el citoplasma se encuentran una serie de estructuras conocidas como organelas y vacuolas que cumplen diversas funciones.

Encontramos diferencias notables entre las células de las bacterias y las algas azules y entre los animales y las plantas, que nos permiten diferenciarlos en dos grandes grupos:



Los **eucariotas** disponen de un verdadero núcleo que contiene un conjunto de cromosomas que tras su duplicación se separan en un proceso denominado mitosis. El citoplasma contiene mitocondrios y plástidos. La membrana citoplasmática se continúa hacia el interior en el retículo endoplasmático y la membrana nuclear.



## *La membrana celular*

*retículo endoplasmático*: función síntesis de proteínas, lípidos y detoxificación

*Vesículas y cisternas*, cuya superficie se halla recubierta de ribosomas que generan distintas sustancias.

Los plástidos son formaciones ricas en lípidos que contienen ADN.

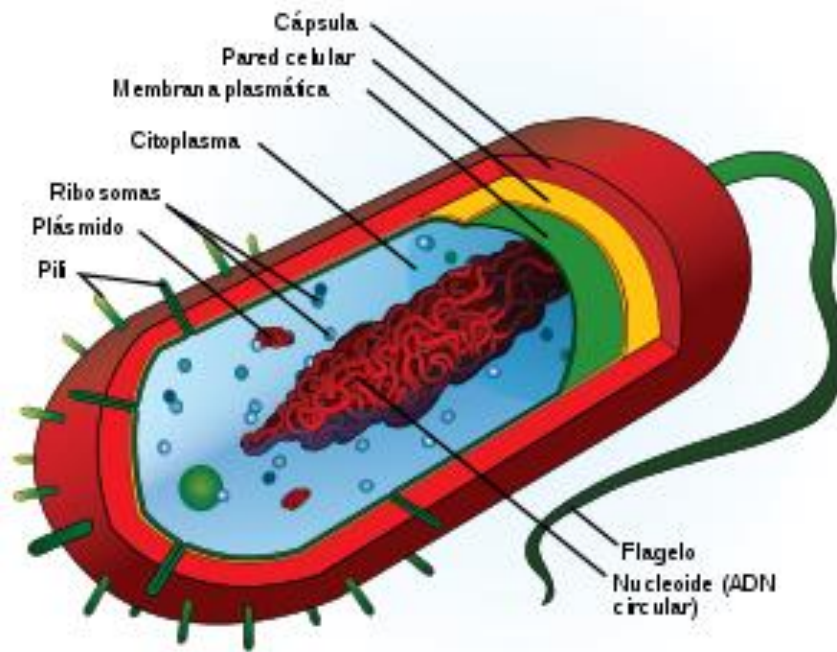
Los plástidos más importantes y más típicos de la célula eucariota son las mitocondrias y los cloroplastos.

Todas las células eucariotas aeróbicas contienen **mitocondrias**. Sirven para la respiración y para la obtención de energía oxidativa y contiene los enzimas para la síntesis de grasas, del ciclo de los ácidos tricarbónicos, de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa.

Los **cloroplastos** transforman la energía luminosa en energía química.



Los **procariotas** no poseen un núcleo rodeado por una membrana. El DNA, incluido en el nucleoplasma, se encuentra libre en la célula. La subdivisión de la célula en cavidades separadas se halla menos marcada; faltan las mitocondrias y los cloroplastos. Los órganos encargados del movimiento son más sencillos y con una estructura básica distinta de los eucariotas.



## **La célula procariota (protocito)**

En el microscopio nunca se ve una membrana nuclear. La región nuclear se continua con el citoplasma.

No se ha comprobado una distribución del material que contiene DNA en subunidades.

Faltan totalmente los plástidos del tipo de las mitocondrias y los cloroplastos

Plásmidos: moléculas circulares de ADN pequeñas: participan de intercambio genético adaptativo, rastrean o buscan elementos genéticos móviles que permiten adaptarse a nuevas condiciones ambientales.

Las bacterias se multiplican por lo general por división binaria. Tras el alargamiento de la célula construyen de fuera hacia dentro, paredes transversales que van progresando y las células hijas se separan.



## Composición química de la bacterias:

Carbono-----50-55 %  
Nitrógeno-----10-15 %  
Fósforo----- 2-6 %  
Hidrógeno----- 10 %  
Oxígeno----- 20 %

Azufre y otros elementos



Parte de la biología que estudia los genes y los mecanismos que regulan la transmisión de los caracteres hereditarios.

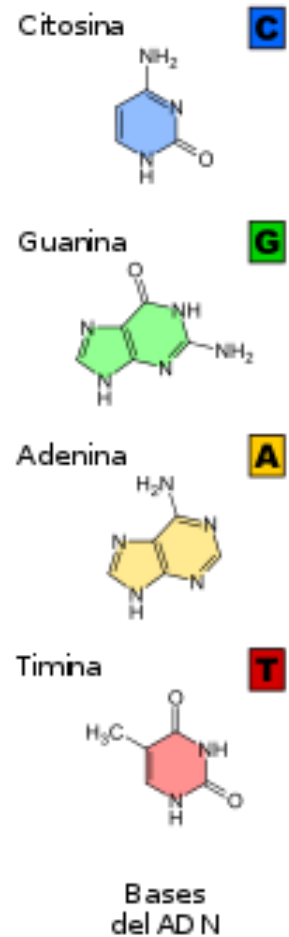
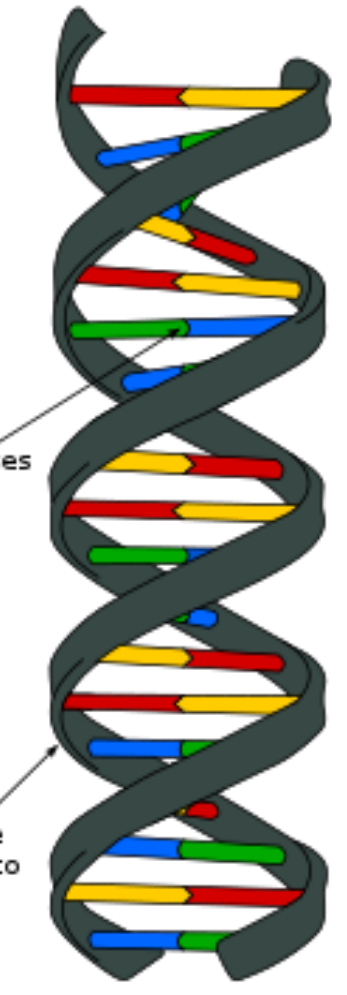
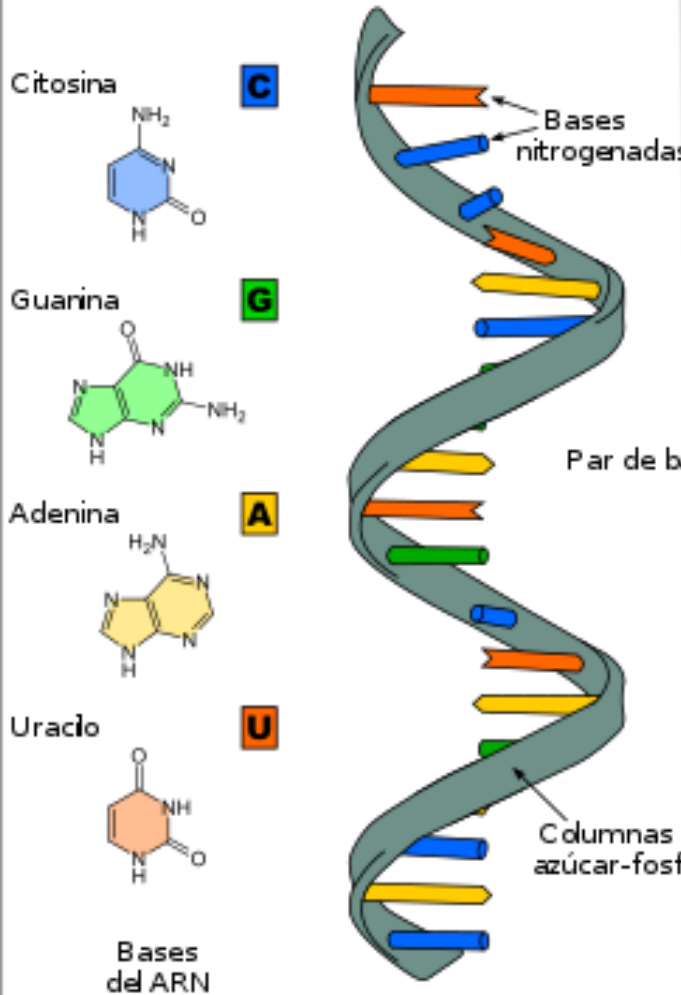
Un **gen** es una unidad de información en una hélice de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, por ejemplo proteínas. Es la unidad molecular de la herencia genética pues almacena la información genética y permite transmitirla a su descendencia. Los genes se encuentran en los cromosomas, y cada uno ocupa en ellos una posición determinada llamada *locus*. El conjunto de genes de una especie se denomina genoma.

El ADN no trabaja sólo, también existe el ARN que ayuda al primero a realizar las operaciones de decodificación de la información genética y de llevar información entre los distintos componentes de la célula ya sea para el funcionamiento o durante el proceso de reproducción.



# COMPOSICIÓN ARN

# COMPOSICIÓN ADN



Acido fosfórico

Desorribosa

Combinaciones de desoxirribosa con las bases:

- Adenosina
- Timidina
- Guanosina
- Citidina

ARN  
Ácido ribonucleico

ADN  
Ácido desoxirribonucleico

**Función:**  
Información de replicación (características del individuo)

**Función: síntesis proteica (transcripción y traducción)**



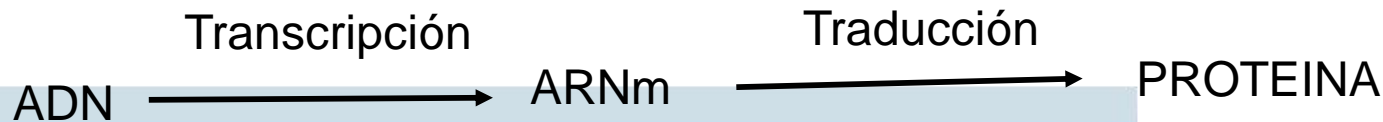


A-U,            T-A,  
G-C,            C-G,

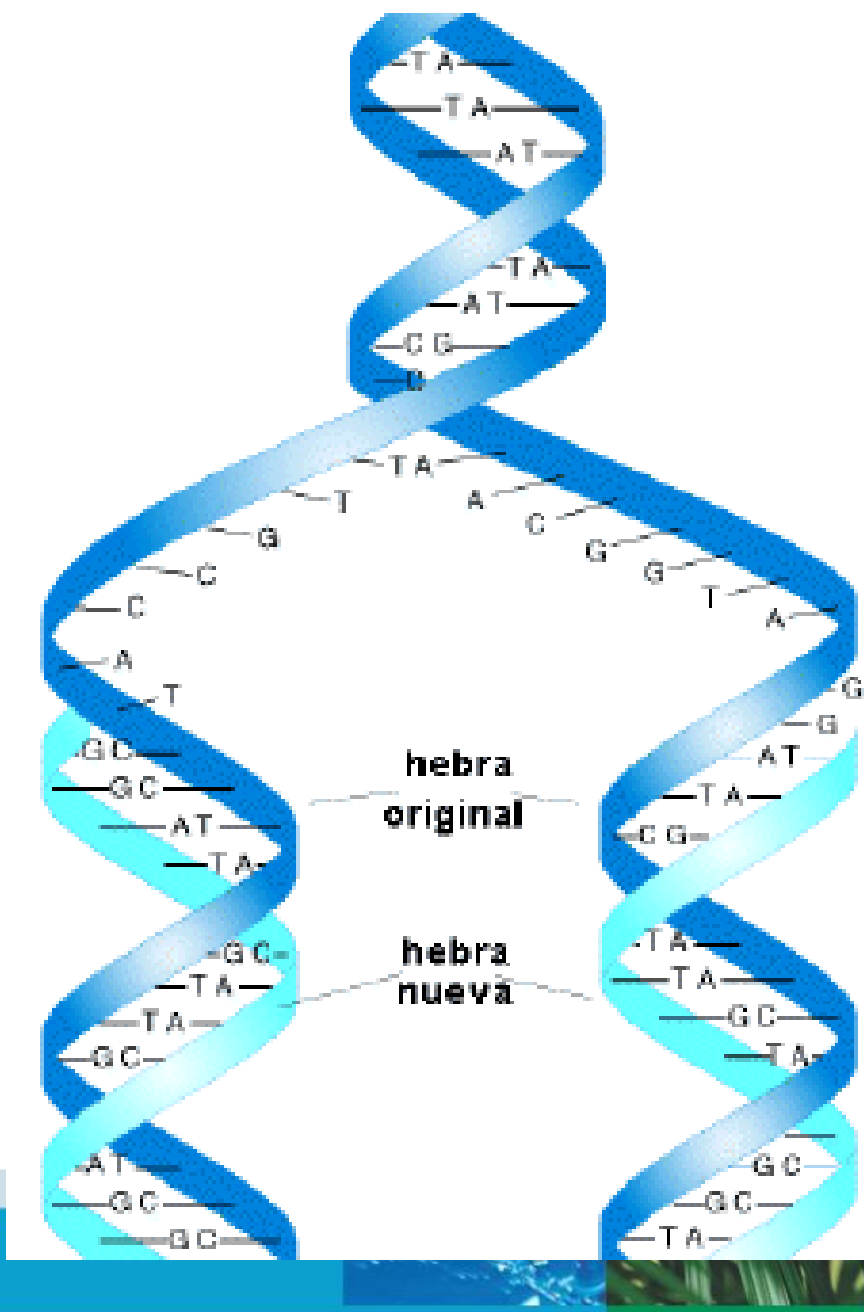
Cada palabra del código está formado por tripletes, el orden de los tripletes indica la formación de un aminoácido. Existen 64 combinaciones

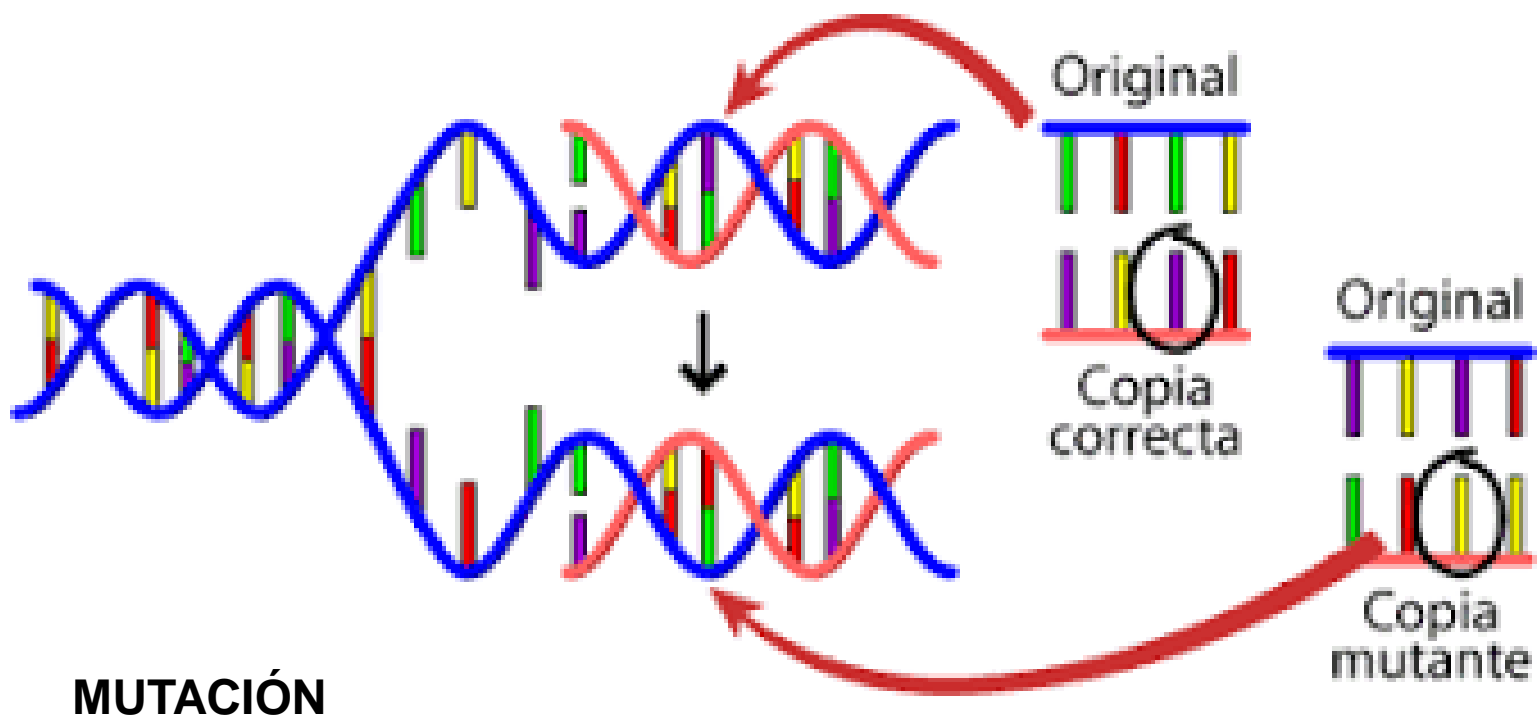
	U	C	A	G
U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA ---- UAG ----	UGU Cys UGC Cys UGA ---- UGG Trp
C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg
A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg
G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Met	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Asp GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly

Phe: fenilalanina; Leu: leucina; Ile: isoleucina; Met: metionina; Val: valina; Ser: serina; Pro: prolina; Thr: treonina; Ala: alanina; Tyr: tirosina; His: histidina; Gln: glutamina; Asn: asparagina; Lys: lisina; Asp: ác. aspartico; Glu: ác. glutámico; Trp: triptofano; Cys: cistina; Gly: glicina; Arg: arginina



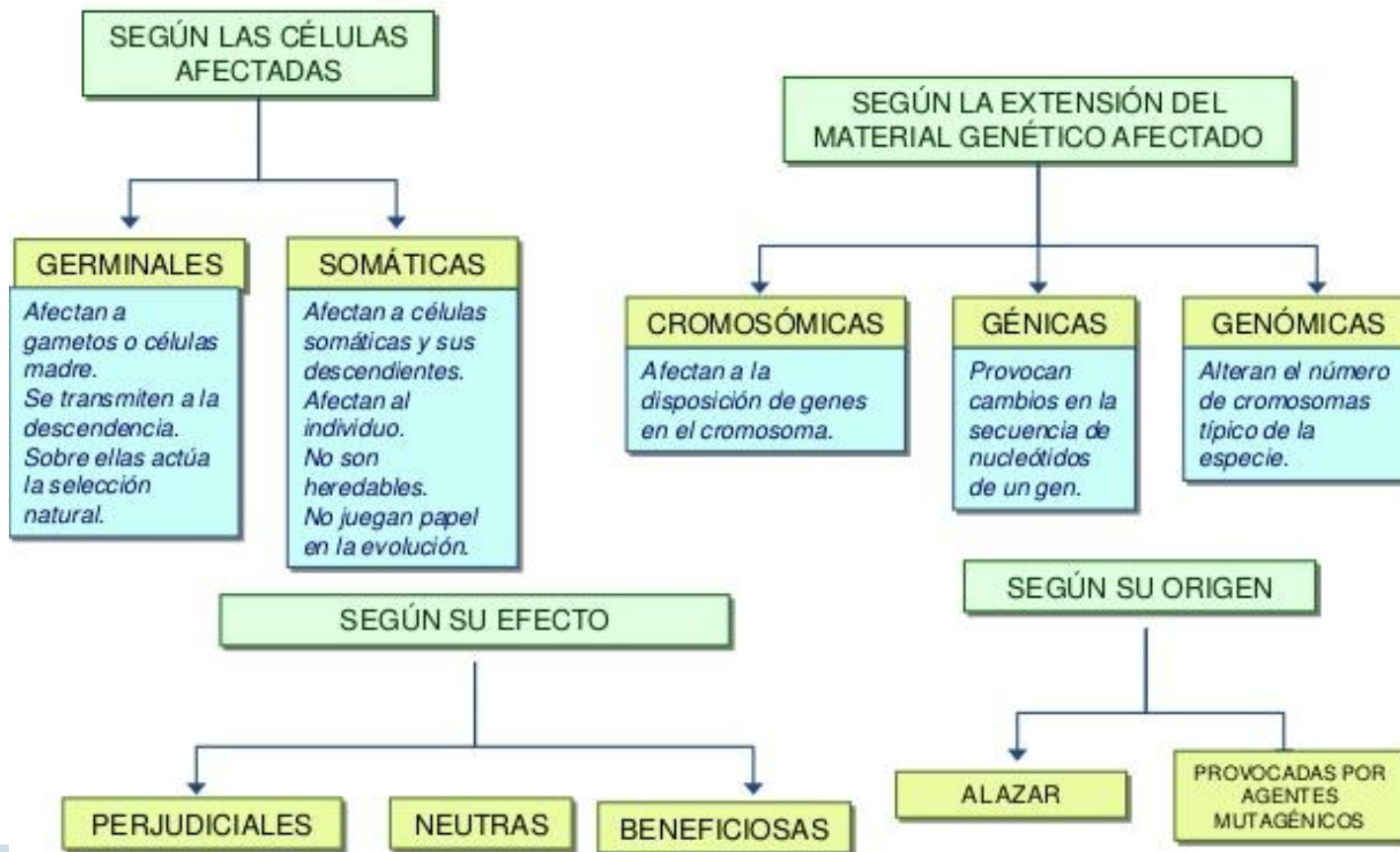
# REPRODUCCIÓN DEL ADN







# TIPOS DE MUTACIONES



## Mejoramiento de microorganismos industriales

1. *Selección natural*

2. *Mutación inducida.*

1) Físicos, como la luz ultravioleta

2) Químicos

a) Acido nitroso

b) N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG). Es uno de los mutágenos más potentes,

c) Análogos de base. Producen transiciones, como el 5-bromuracilo y la 2-aminopurina

d) Mutágenos estructurales, como la proflavina o naranja acridina

3) Mutantes con niveles mejorados de metabolitos primarios



## Regulación del metabolismo

En la inhibición, el producto final de una vía metabólica inhibe la actividad de una enzima (normalmente la primera) de su vía de formación, cuando se ha sobrepasado un valor máximo de concentración intracelular de dicho producto

La represión es aquella donde el producto final de una vía metabólica previene la síntesis de una enzima o de todas las que catalizan la vía mencionada. Esto ocurre a nivel de ácido desoxirribonucleico (ADN), impidiendo la transcripción del gen a ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Este mecanismo es de acción más lenta que el anterior, ya que permite actuar a las enzimas preformadas.

Los mecanismos de regulación son más complejos en caso de vías biosintéticas ramificadas donde los productos de cada brazo son raramente requeridos por el organismo en igual proporción. Los procesos de control de estos son los siguientes:

a) por isoenzimas; b) concertado o multivalente; c) cooperativo; d) acumulativo; e) secuencial.



Como se ve, la concentración de un metabolito microbiano es controlada por una variedad de mecanismos. El conocimiento de la vía metabólica y su control facilita la construcción del mutante deseado. Estos pueden tener distintas modificaciones:

- a) el mutante no reconoce la presencia del inhibidor o represor;
- b) No se produce producto final, que es el que controla la enzima clave de la vía metabólica;
- c) el producto final es eliminado de la célula debido a una modificación en la permeabilidad de la membrana celular.

Los mutantes que no producen inhibidores o represores por producto final pueden ser empleados para la producción de intermediarios en caminos no ramificados, o de intermediarios y productos finales en caminos ramificados.

Mutantes resistentes a análogos de aminoácidos han sido empleados en procesos de mejoramiento de cepas, para la obtención de antibióticos.





## **Mutantes productores de enzimas de interés industrial**

Las técnicas de mutación en este caso pretenden alterar los mecanismos de control para obtener mutantes que puedan producir enzimas en ausencia de inductor y aún en presencia de represores. Las mutaciones pueden tener lugar en un gen regulador, eliminando la producción de un represor activo, o si se producen en el operador, se podría evitar la unión del represor.

**Mutantes con mejores rendimientos de metabolitos secundarios :** Metabolitos secundarios son sustancias no imprescindibles para las funciones vitales como por ejemplo alcaloides, toxinas, antibióticos, giberelinas, etc.

### *3. Recombinación genética*

El mejoramiento de una cepa industrial empleando técnicas de mutagénesis selección conduce a la creación de líneas divergentes.

Virus

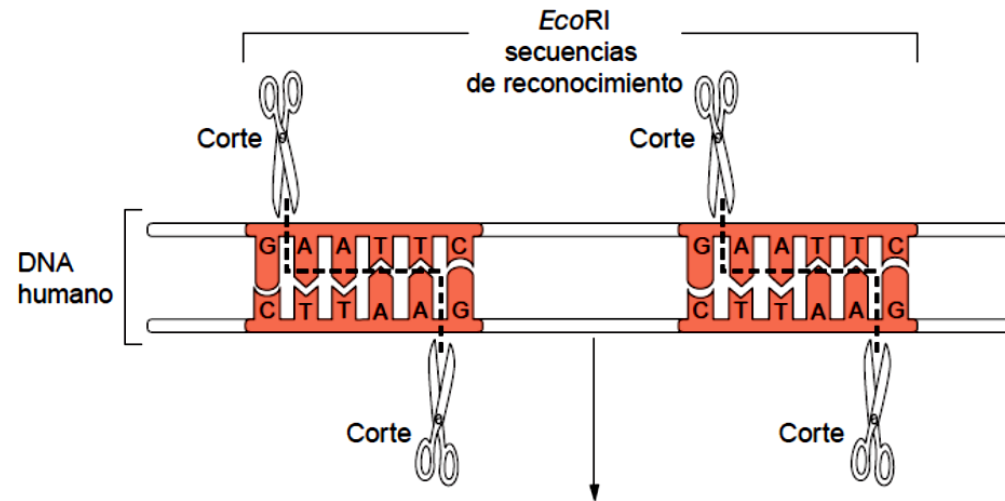
Fusión celular.

### **4) Obtención de nuevas cepas por ingeniería genética**

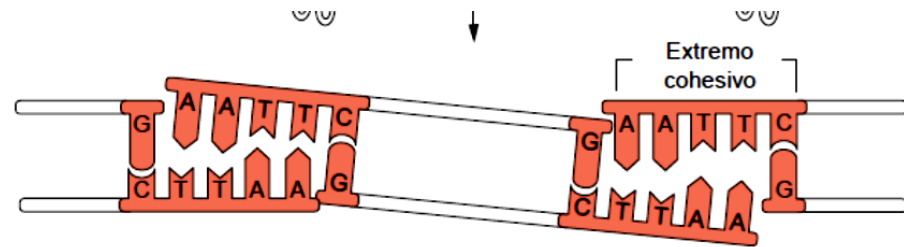


## Enzimas de restricción y plásmidos o vectores de DNA

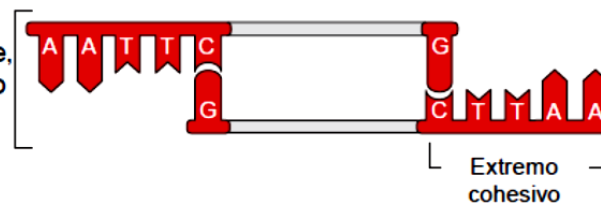
1) La enzima de restricción corta DNA de doble hélice en su secuencia de reconocimiento particular.



2) Estos cortes producen fragmentos de DNA con extremos cohesivos.

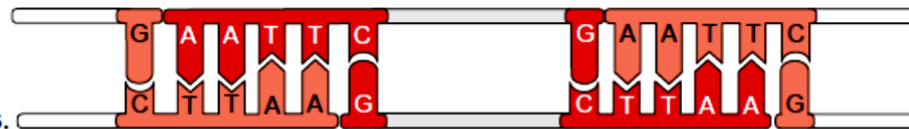


DNA de otra fuente, tal vez un plásmido bacteriano



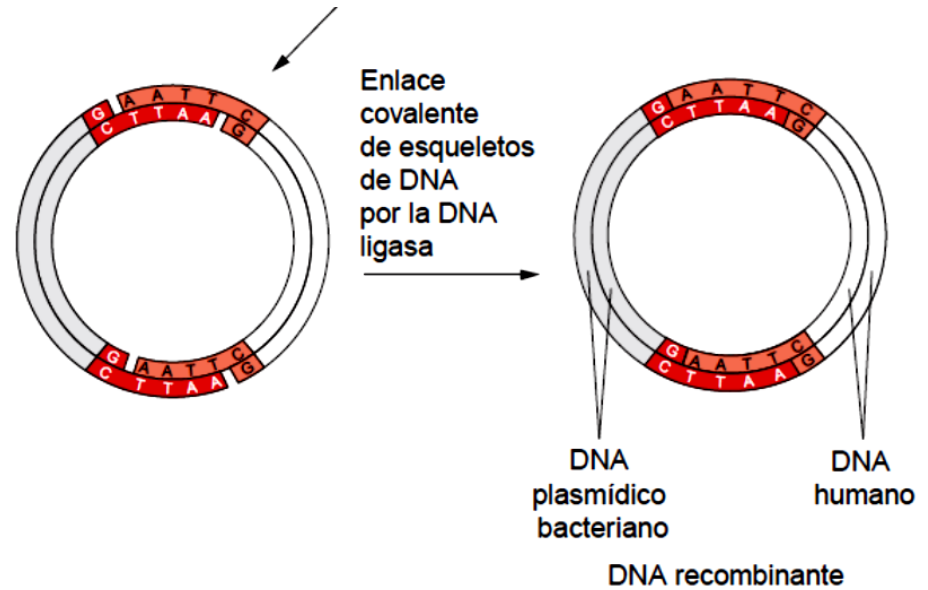
Enlace de hidrógeno de los extremos cohesivos

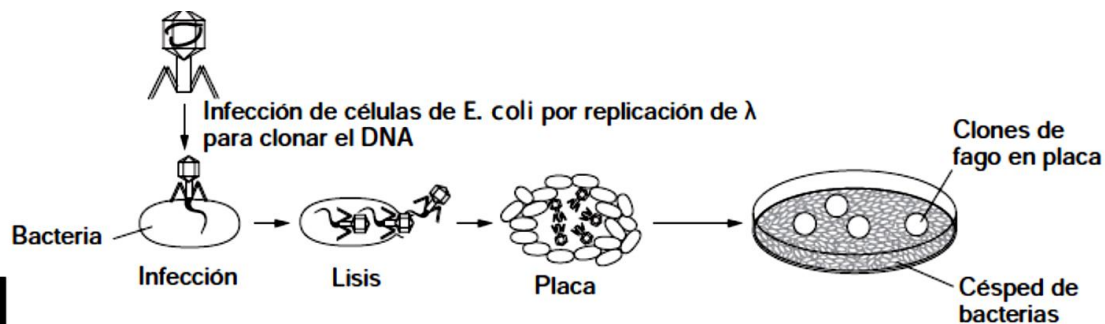
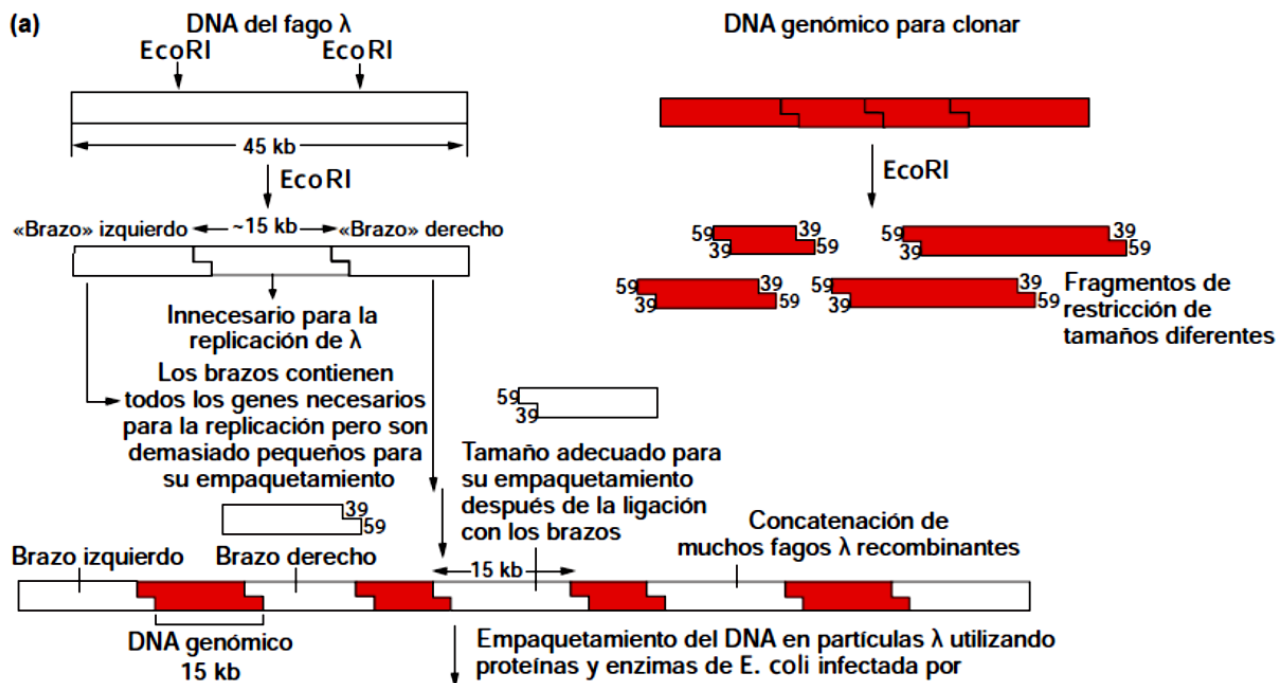
3) Cuando dos fragmentos de DNA cortados por la misma enzima de restricción vienen juntos, pueden unirse por emparejamiento de bases.

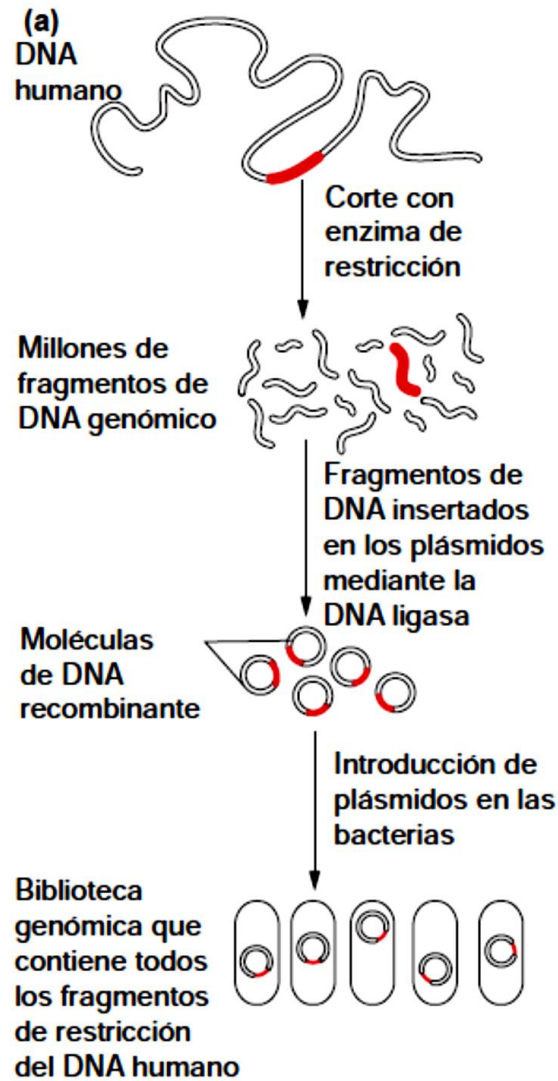


4) Los fragmentos unidos normalmente formarán una molécula lineal o bien una circular, como se muestra aquí en el caso de un plásmido. Sin embargo, también se pueden dar otras combinaciones de fragmentos.

5) La enzima DNA ligasa se utiliza para unir los ejes de los dos fragmentos de DNA, produciendo una molécula de DNA recombinante que contiene DNA humano y del plásmido.





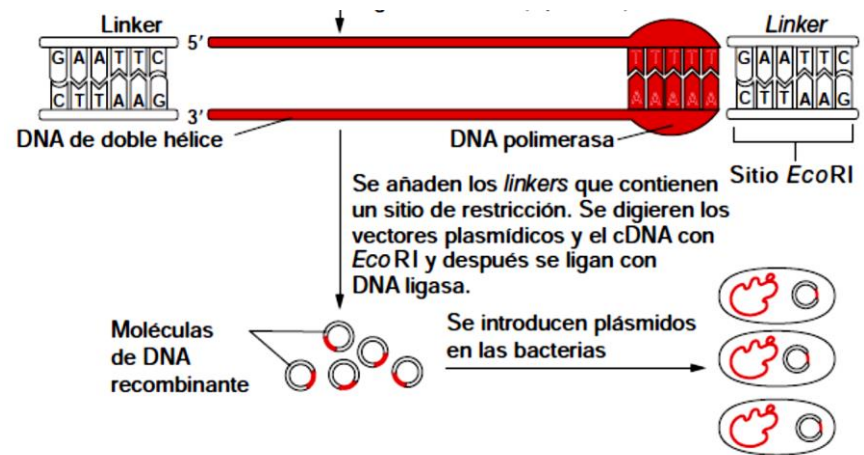
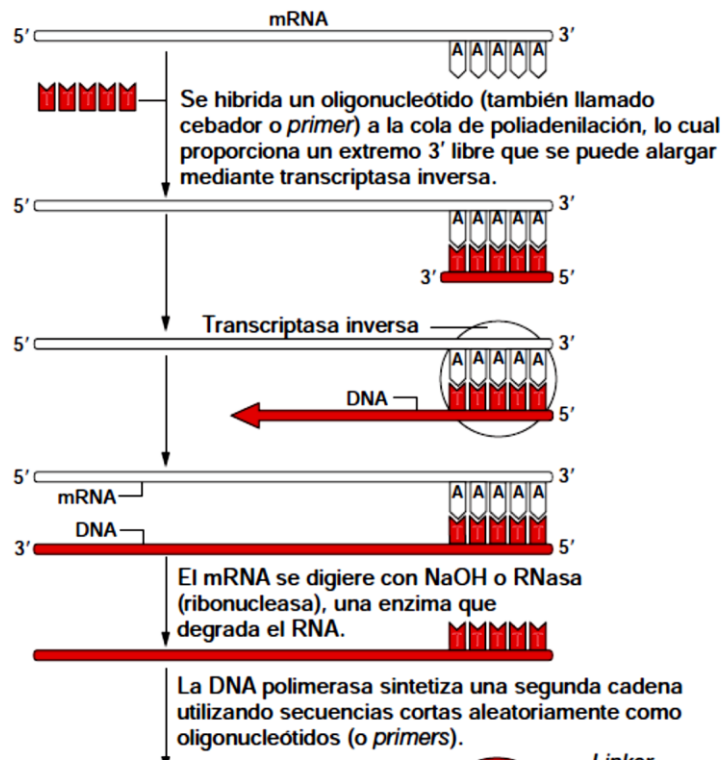


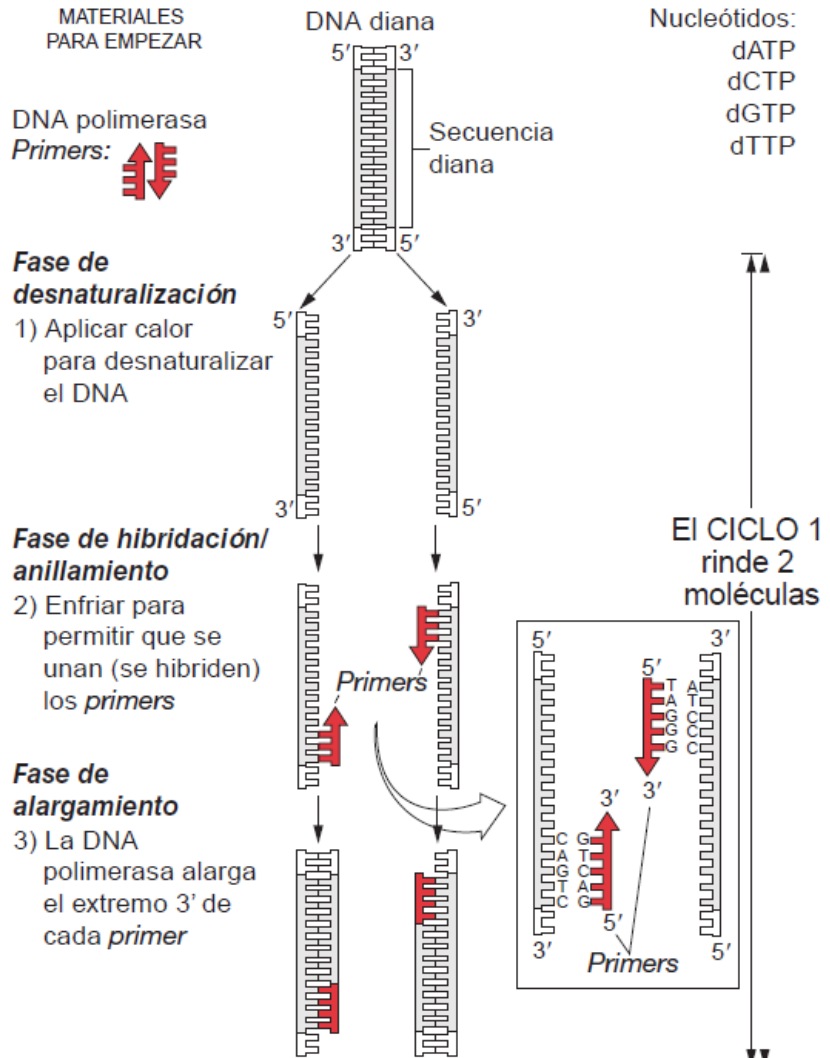
## Bibliotecas de microorganismos modificados



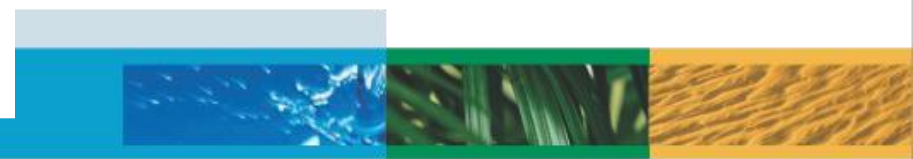
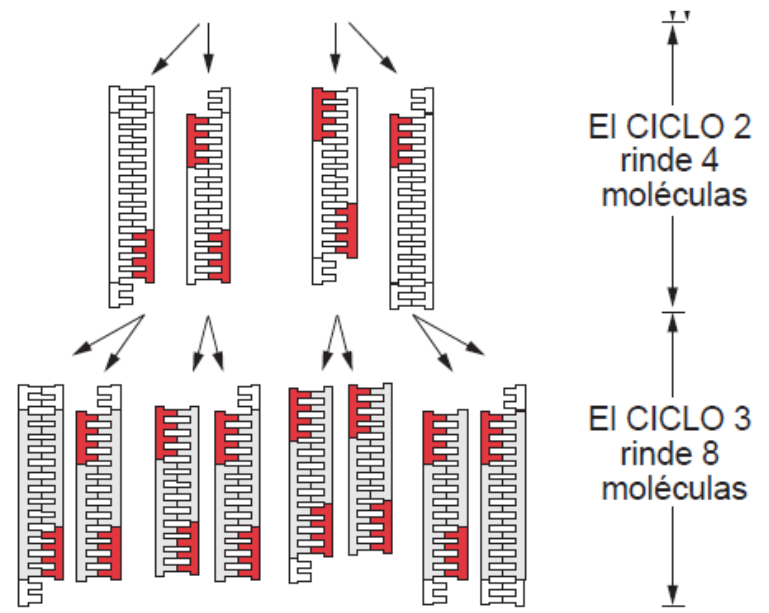
# Bibliotecas de microorganismos modificados

(b)





## Reacción de cadena polimerasa





## LAS ENZIMAS

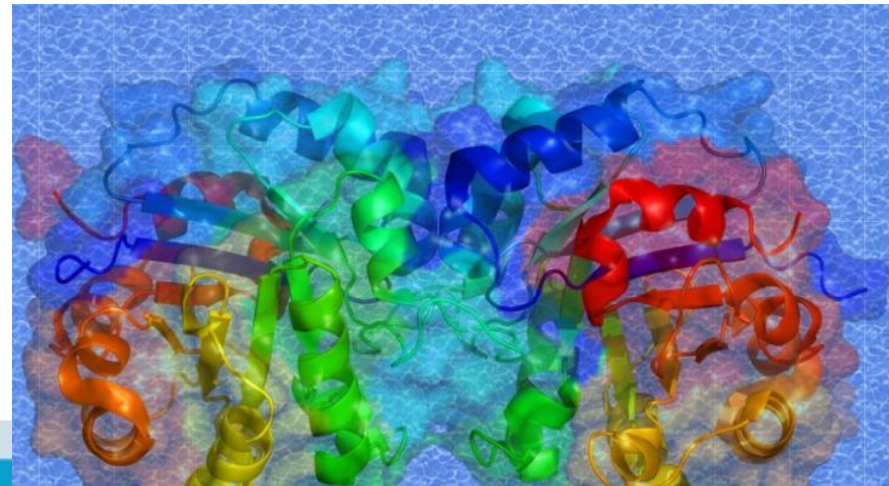
Son proteínas que catalizan reacciones químicas en las células o bien fuera de estas.

Interesan en nuestro estudio las exoenzimas ya que son de aplicación industrial.

Cada enzima es altamente específica para la reacción que cataliza.

Muchas enzimas necesitan co-factores (co-reactivos, cosustratos) para cumplir su función catalítica.

Principal característica. Evita formación de subproductos.



## Características de las enzimas

- Son Proteínas de alto peso molecular (macromoléculas,  $10^4$  a  $10^6$  g/mol,  $10^2$  a  $10^4$  aminoácidos)
- Su actividad depende de la integridad de su conformación proteica.
- Puede ocurrir que haya metales que forman parte de su centro activo, o de otra parte de la enzima (co-factor).
- Los reactivos de la reacciones catalizadas por enzimas se denominan sustratos.
- Los enzimas son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.
- Esta especificidad está determinada por el centro activo de la enzima (en donde se hallan los grupos químicos responsables de la catálisis).



**Identificación:** por la actividad que realizan: sacarasa hidrólisis de sacarosa  
glucosa-deshidrogenasa oxida la glucosa a ác. glucónico

**Clasificación:** por las reacciones que catalizan

a) OXIDO-REDUCTASAS (deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, etc)  
actúan sobre los grupos: CH-OH, C=O con NAD, NADP, citocromos, etc, como  
aceptores de O<sub>2</sub>, CH-CH

b) TRANSFERASAS: transfieren grupos  
-CH<sub>2</sub>OH hidroximetil-transferasas  
-COOH carboxil transferasas  
-OPO(OH)<sub>2</sub> fosforil transferasas

c) HIDROLASAS: hidrolizan moléculas:  
péptido-peptido hidrolasas (tripsina)  
glicerol-éster hidrolasas (lipasa)

d) LIASAS: pérdida de grupos pero no por hidrólisis: carboxi (o decarboxi)-lasas

e) ISOMERASAS: cis-trans

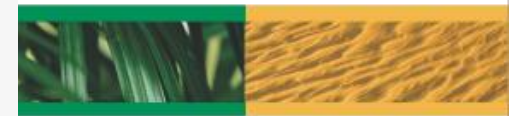
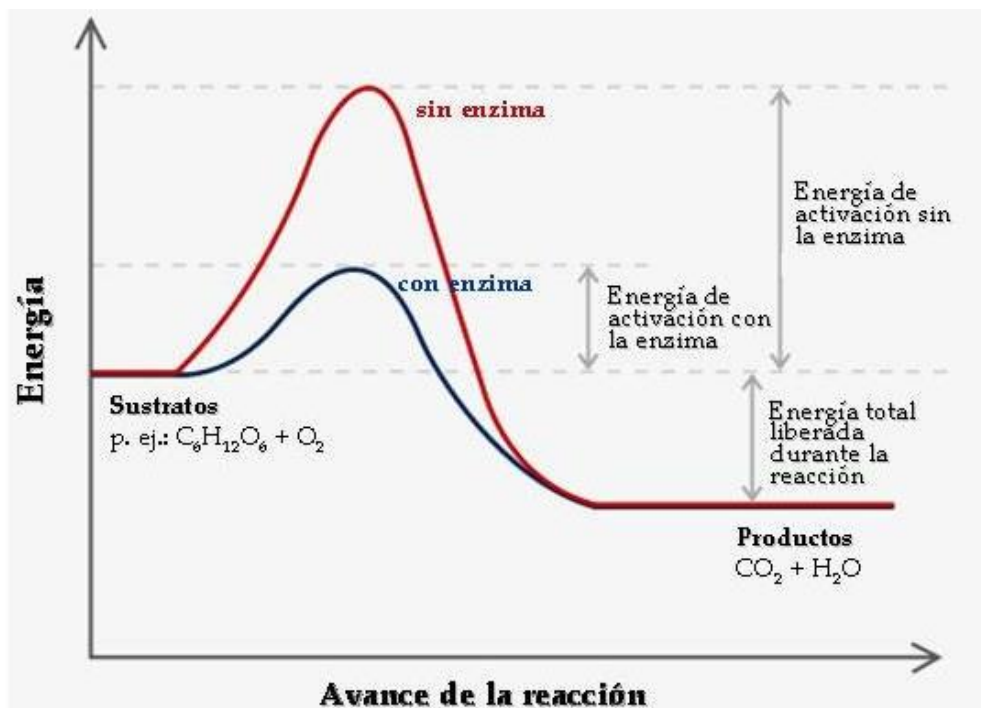
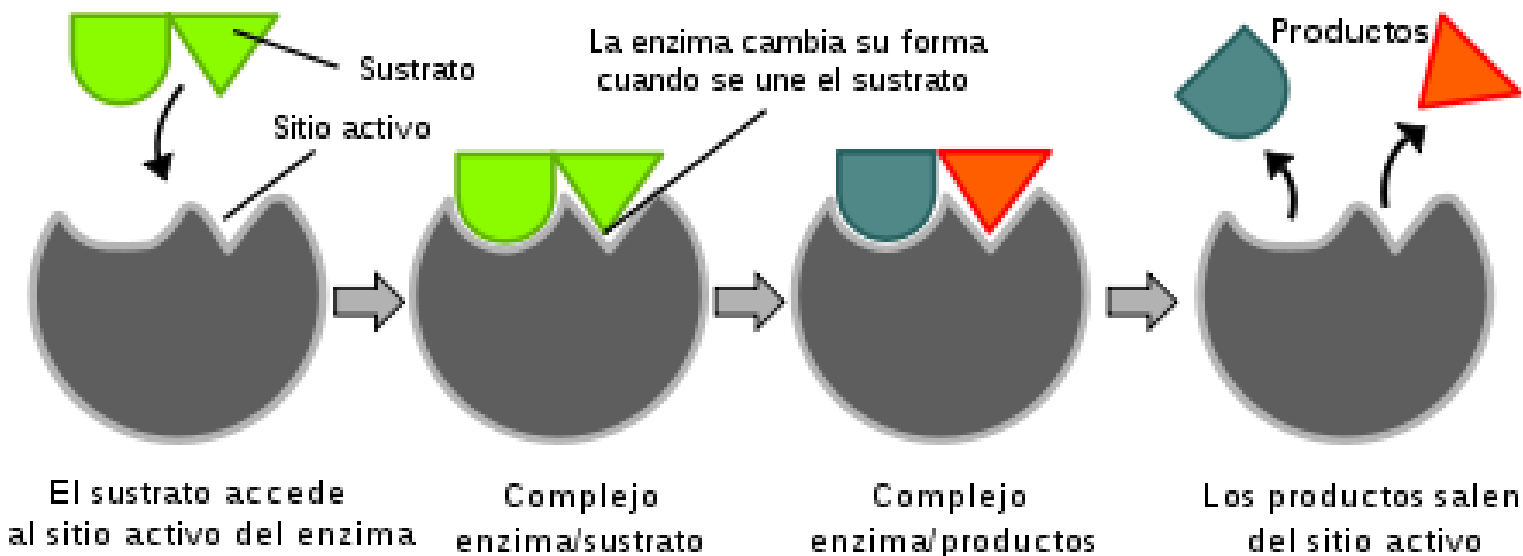
f) LIGASAS o SINTETASAS: formación de enlaces CO, CS, CN, HH, etc.

## ¿Cómo actúan los enzimas?

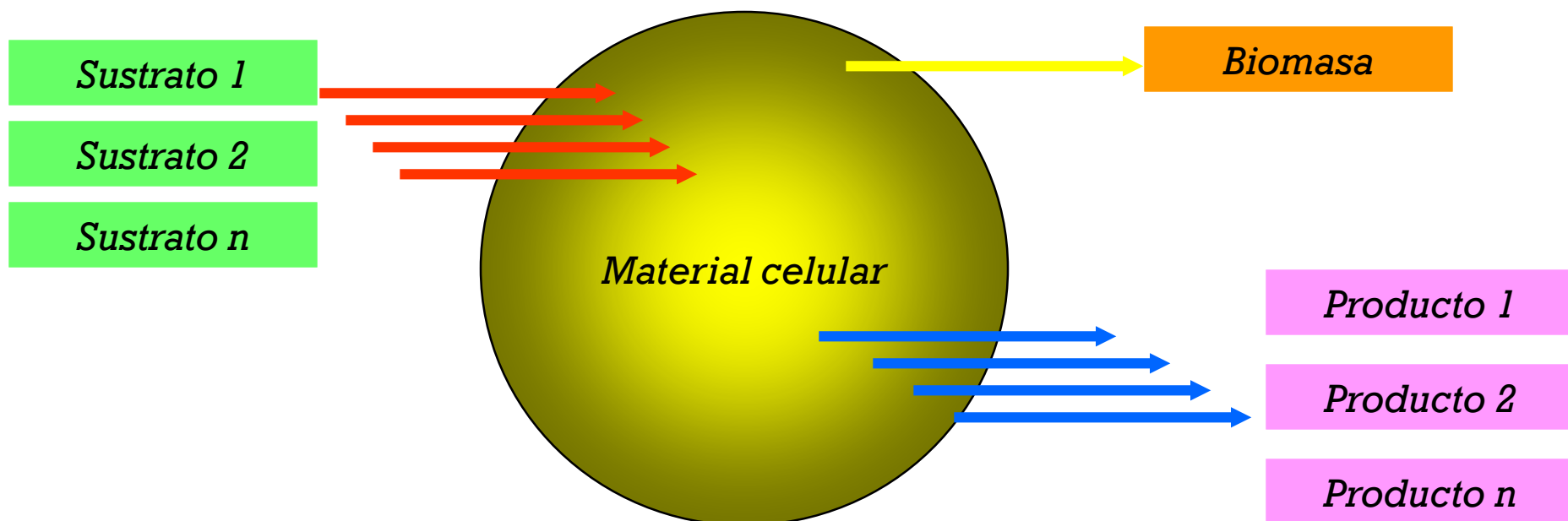
En una reacción catalizada por un enzima:

- La sustancia sobre la que actúa el enzima (**sustrato**).
- El sustrato se une a una región concreta del enzima (**centro activo**).
- Un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato.
- Un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción.
- Una vez que se formaron los **productos** la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción

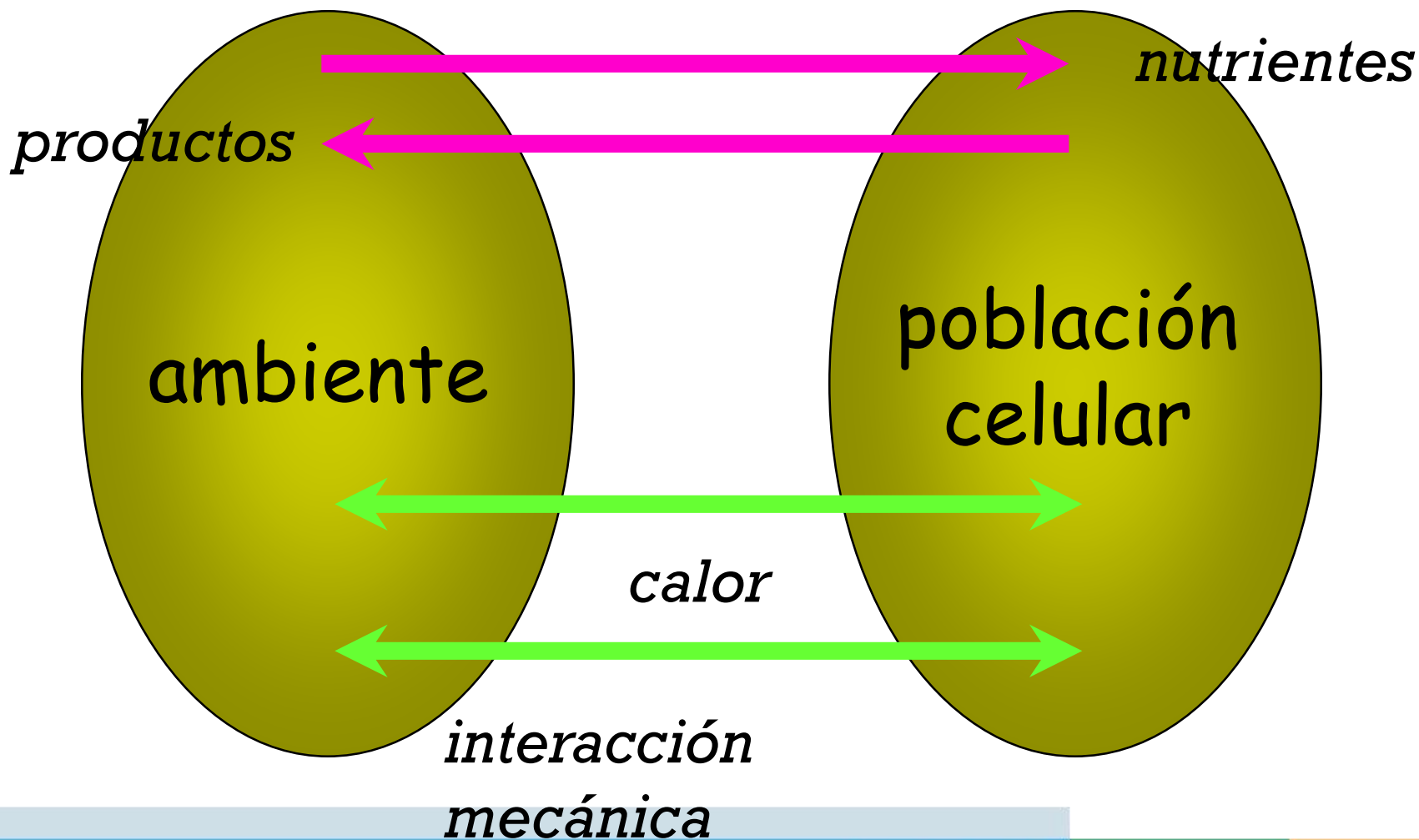




# CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS VISTA CONCEPTUAL



# INTERACCION AMBIENTE-POBLACION CELULAR



# EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

## Metabolismo

Conjunto de reacciones bioquímicas realizadas en el interior de la célula. Están catalizadas por enzimas

## Catabolismo

Conjunto de reacciones por las cuales los microorganismos generan energía

## Anabolismo

Conjunto de reacciones mediante las cuales los microorganismos consumen energía.

Métodos de reproducción:

1. Reproducción sexual
2. Reproducción asexual:
  - Mitosis: 1-2-4-8-16-32-.....
  - Gemación: aparecen uno o más brotes





## FISIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO

**Crecimiento** es el aumento irreversible de materia viva, que por lo general, se efectúa mediante el incremento y la división de las células.

En los organismos pluricelulares aumenta el tamaño, en los unicelulares el número, en éstos debe diferenciarse del aumento del número de células y el incremento de la masa celular.

### Crecimiento exponencial y tiempo de generación

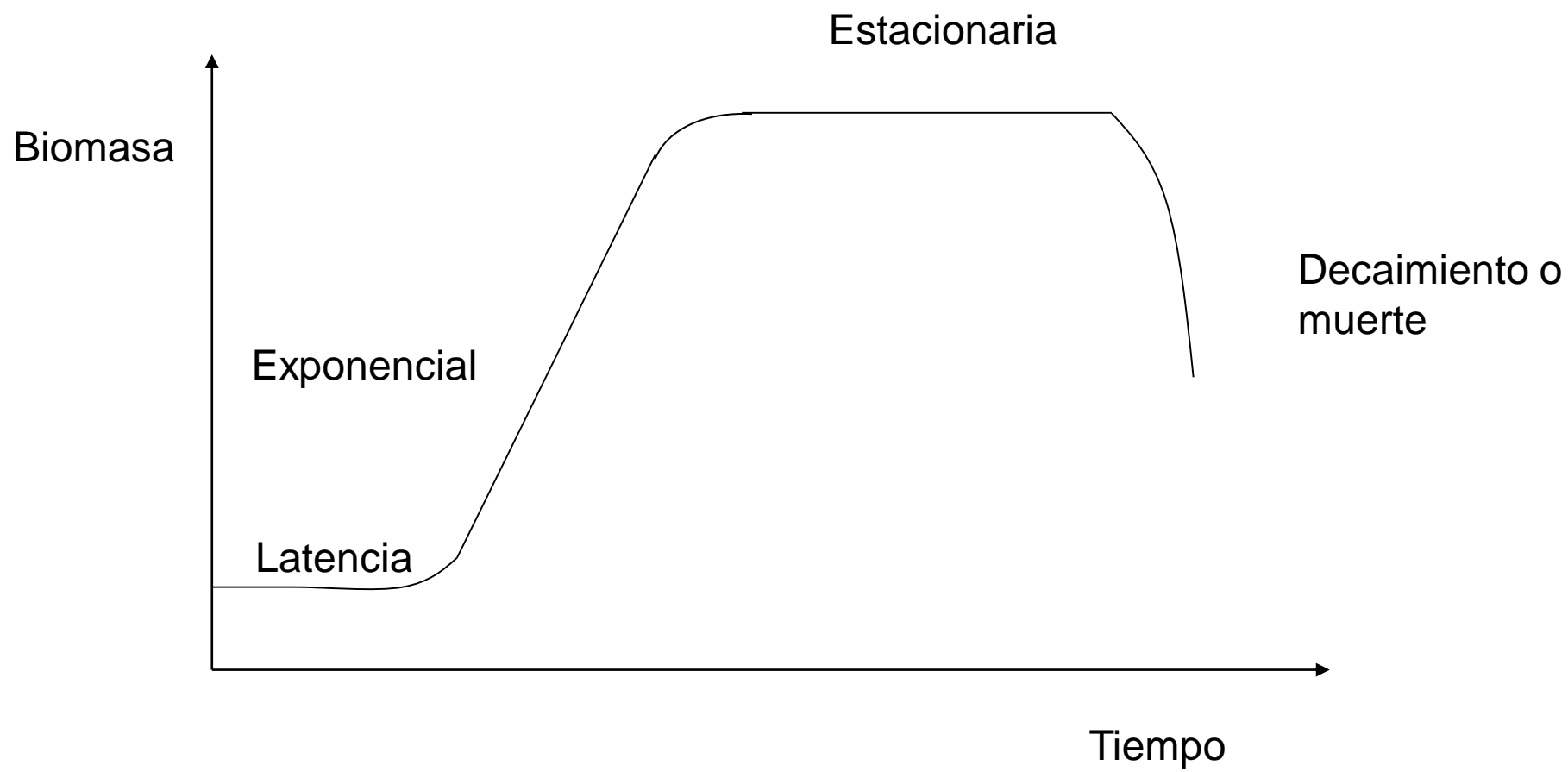
Las bacterias se multiplican por división binaria; su multiplicación representa una progresión geométrica  $2^0, 2^1, \dots, 2^n$ .

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

$$v = n / t = (\log N - \log N_0) / \log 2 (t - t_0)$$





# CONDICIONES NUTRICIONALES

Fuente de Carbono

Fuente de Nitrógeno

Fuente de fósforo

Fuente de oxígeno (u otro aceptor de electrones)

Fuente de Potasio

Fuente de elementos minoritarios y de oligoelementos



# Fuente de elementos minoritarios y de oligoelementos

- Azufre
- Magnesio
- Calcio
- Manganeso
- Hierro
- Zinc
- Cobre
- Elementos traza: vitaminas, factores de crecimiento, cobalto, molibdeno, etc, dependiendo de los microorganismos

**Auxotróficos** son los organismos que requieren algún factor de crecimiento; y si la auxotrofia a ocurrido por mutación y no requieren elementos se denomina **prototrófica**.



## TIPOS DE NUTRICIÓN

Para describir los tipos de nutrición tendremos en cuenta también las fuentes de energía, el dador de Hidrógeno y la fuente de Carbono.

- **Fotótrofos** (fotosintéticos), son los organismos capaces de utilizar la radiación electromagnética (luz) como fuente de energía para su crecimiento.
- **Quimiótrofos** (quimiosintéticos), ellos obtienen la energía a partir de reacciones de óxido reducción de los sustratos utilizados como sustancias nutritivas.
- **Litótrofos**, son capaces de utilizar dadores inorgánicos de H ( $H_2$ ,  $NH_3$ ,  $H_2S$ ,  $Fe^{++}$ , CO y otros).



## TIPOS DE NUTRICIÓN 2

- ***Organótrofos***, todos los organismos que utilizan compuestos orgánicos como dadores de Hidrógeno.
- ***Autótrofos***, son todos aquellos microorganismos capaces de obtener la mayor parte del carbono celular por fijación de dióxido de carbono.
- ***Heterótrofos***, los que obtienen el carbono celular de compuestos orgánicos.



Con relación a la convivencia de microorganismos con plantas y animales superiores y con otros microorganismos podemos clasificarlos:

- ***Simbiosis***, es la unión de organismos de especies distintas que viven en contacto espacial siempre que los dos miembros salgan beneficiados.
- ***Comensalismo***, cuando el beneficio mutuo es menos ostensible, pero sin perjuicio para ninguno de los miembros.
- ***Parasitismo***, sólo uno de los miembros sale beneficiado, el parásito, mientras que el otro, el huésped, sale perjudicado pudiendo ser eliminado. Los *parásitos facultativos* pueden crecer en ausencia del huésped; los *parásitos obligados* dependen de uno o más huéspedes, no pueden vivir fuera del huésped, de sus tejidos (parásitos tisulares) o fuera de sus células (parásitos celulares).
- ***Saprotitismo***, constituye la alimentación a partir de materia orgánica muerta, es un tipo especial del tipo heterótrofo.

## ACEPTOR DE ELECTRONES

Los aerobios obligados se encuentran en los ambientes aerobios y necesitan oxígeno porque son incapaces de generar energía por la fermentación.

El oxígeno es esencial porque es un aceptor terminal de electrones y es necesario para la biosíntesis de los esteroides y los ácidos grasos no saturados.

Los organismos facultativos obtienen energía a través de la fermentación o de la fosforilización oxidativa. No es indispensable pero crecen mejor con oxígeno.

Los microorganismos microaerofílicos necesitan una tensión de oxígeno muy baja.





Los **anaerobios** son los que no pueden utilizar oxígeno como aceptor de electrones.

Aerotolerantes, que no utilizan oxígeno pero pueden desarrollarse en presencia o ausencia de él;

Aerófilos obligados o estrictos (Anaerobios estrictos) para los cuales la presencia de oxígeno es altamente tóxica. Encontramos entre estos a las bacterias y protozoos.

Los ambientes de bajo potencial redox son ambientes anaerobios. Éstos pueden ser fangos, sedimentos de lagos, ríos, pozos de petróleo, etc.; donde el bajo potencial se debe al consumo de oxígeno, principalmente por bacterias, para su respiración.



# Ciclos metabólicos de interés

## Ciclos en la naturaleza

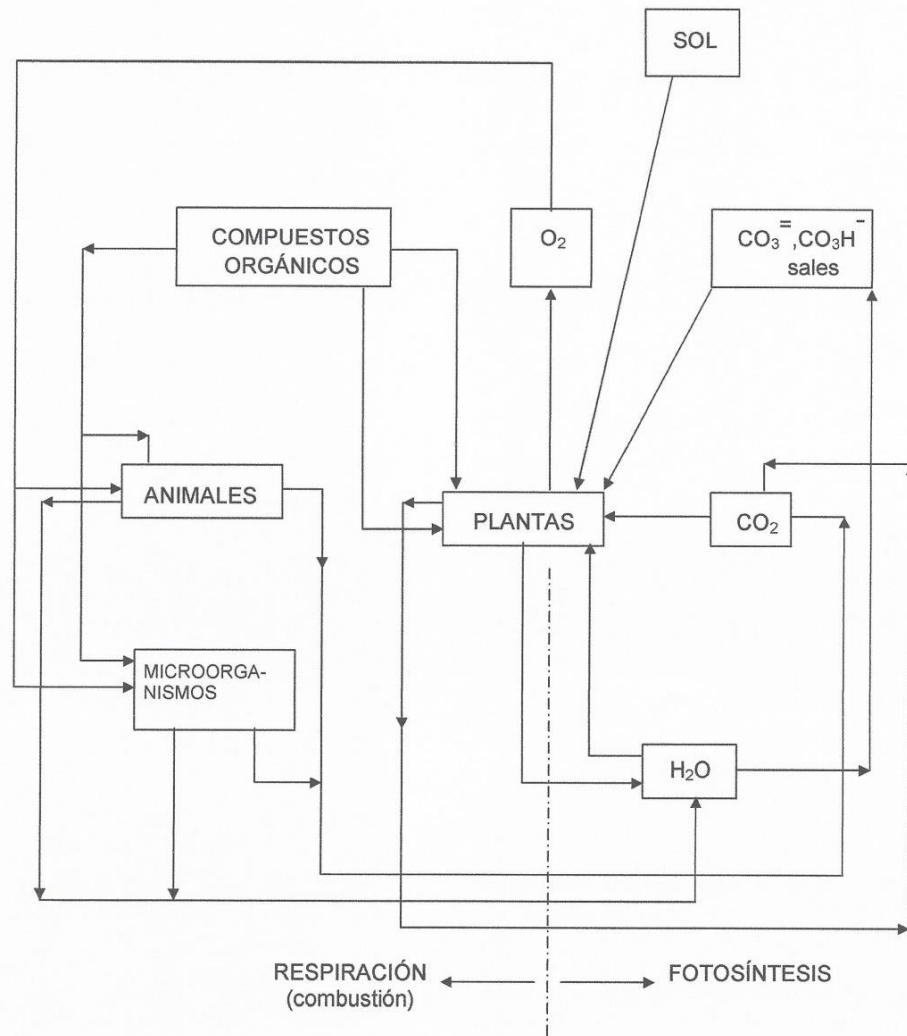
- Carbono
- Oxígeno
- Nitrógeno
- Azufre
- Fósforo

## Ciclos dentro del microorganismo

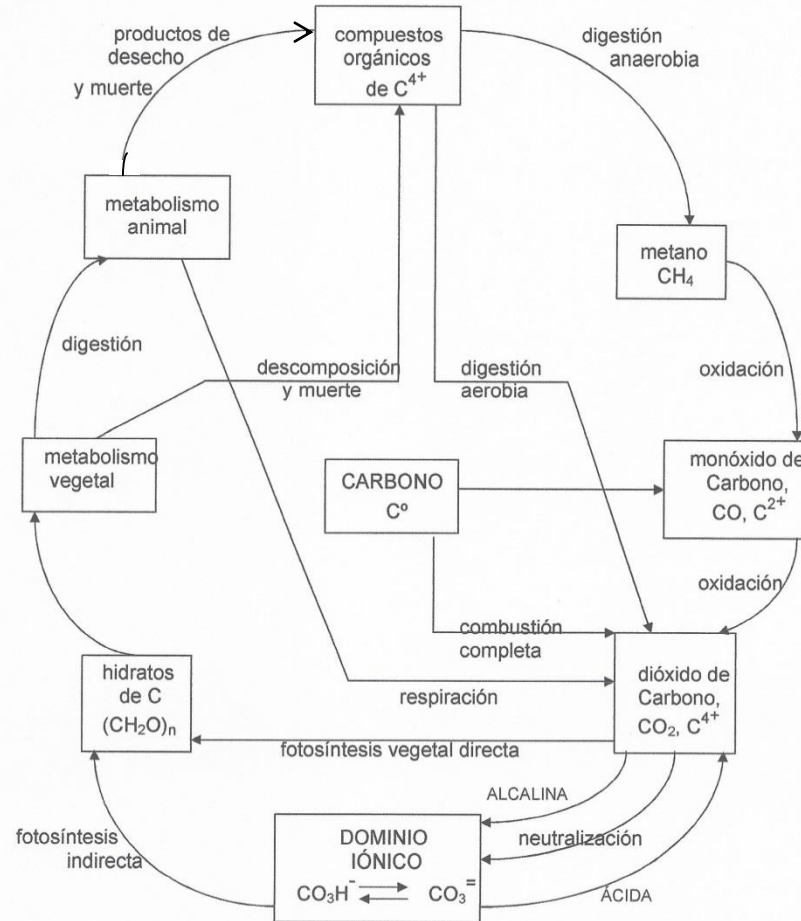
- Vías metabólicas



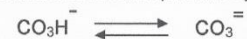
# CICLO DEL CARBONO Y DEL OXÍGENO



**CICLO DEL CARBONO**



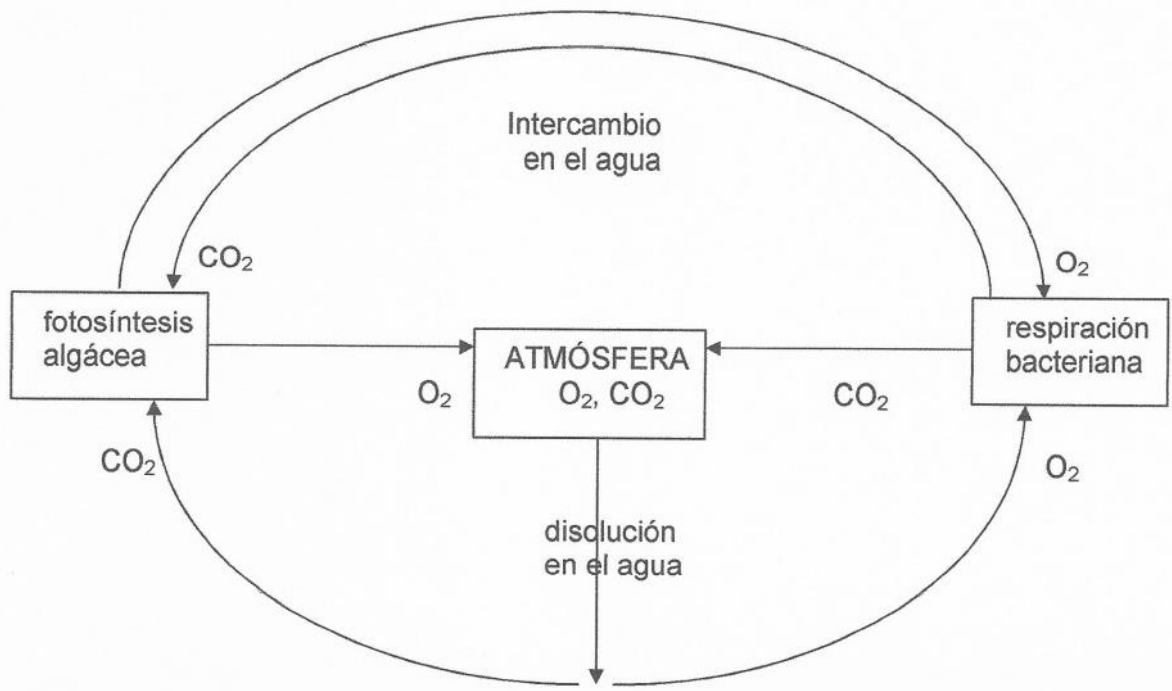
Prácticamente todas las aguas naturales tienen un pH entre 6 y 8.2, caracterizado por el equilibrio:



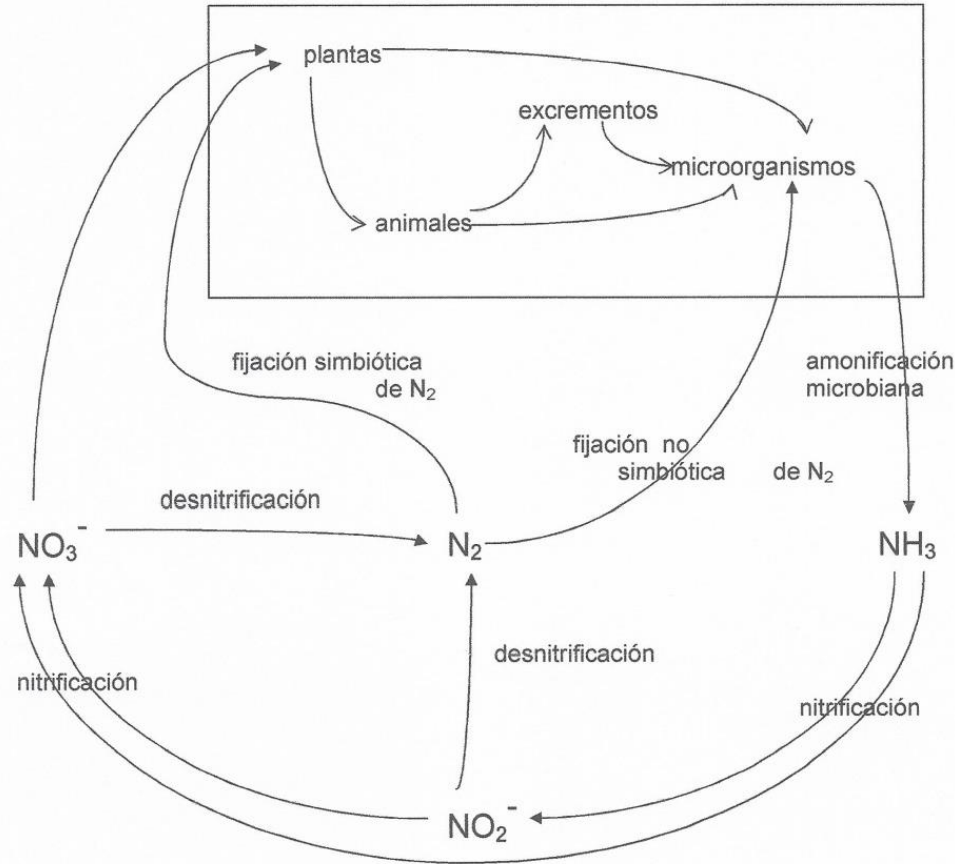
Si el pH excede de 8.2 y la alcalinidad carbonato aparece, se restablece el equilibrio mediante la adición de CO<sub>2</sub>, procedente de la atmósfera o de la respiración de los organismos acuáticos  
 → este efecto "tampón" puede alterarse por la descarga de desechos industriales.



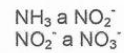
**CICLO DEL OXÍGENO**



# CICLO DEL NITRÓGENO

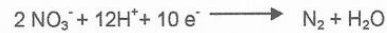


NITRIFICACIÓN



Nitrosomas sp.  
Nitrobacter sp.

DESNITRIFICACIÓN



Micococcus denitrificans  
Thiobacillus denitrificans

FIJACIÓN SIMBIÓTICA

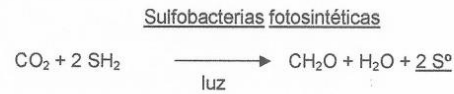
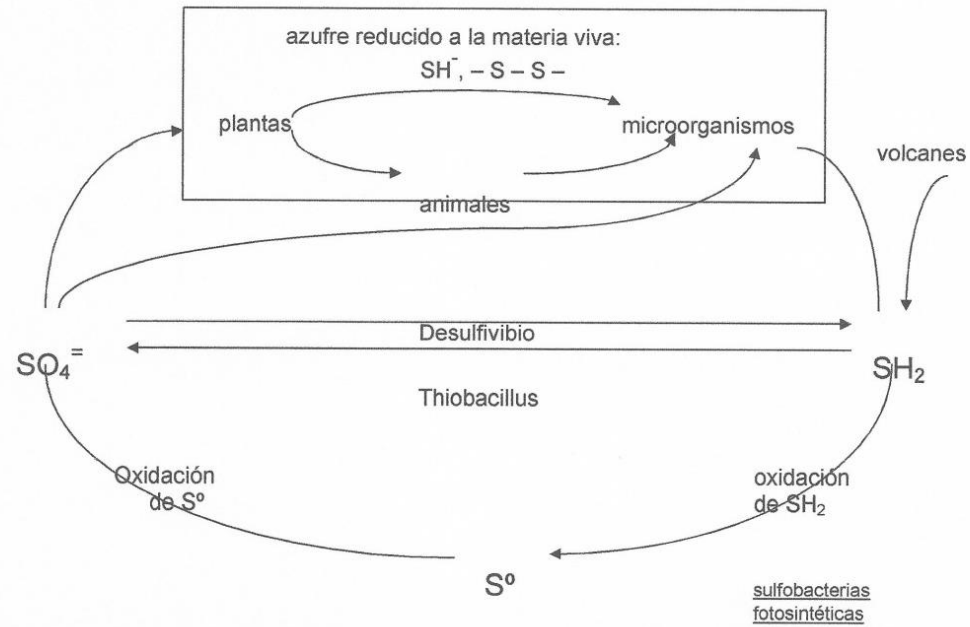
Rhizobium (leguminosas)

FIJACIÓN NO SIMBIÓTICA

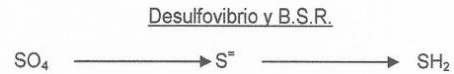
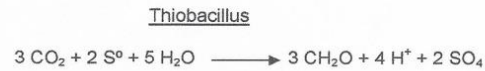
Azotobacter  
Clostridium  
Desulfovibrio



# CICLO DEL AZUFRE

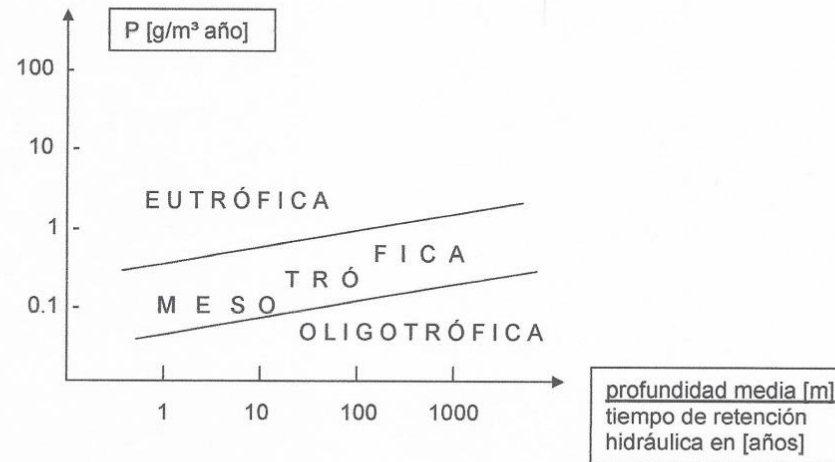


- Thiocystis
- Thiodycton
- Thiopedia
- Lamprocystis
- Chromatium
- Beggiatoa
- Thiothrix, etc

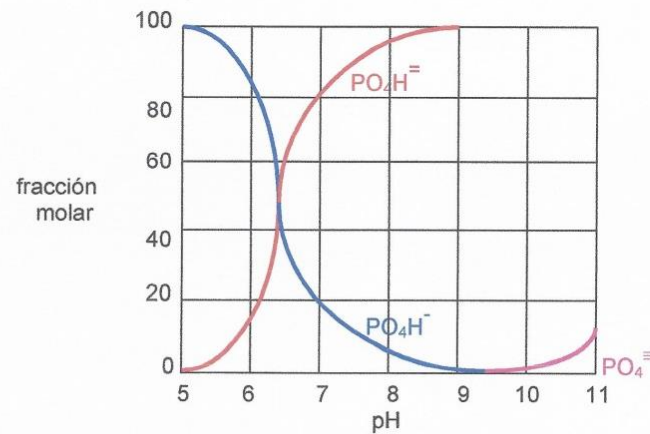


## CICLO DEL FÓSFORO

El P se encuentra como  $\text{PO}_4^{3-}$  en algunos minerales como la APATITA.  
Su presencia en el agua se debe a la descarga de los detergentes y fertilizantes y materia fecal.  
El aporte de P favorece el crecimiento de las algas y termina produciendo el fenómeno de EUTROFICACIÓN que estudiaremos en detalle.



La disponibilidad de P, como formas solubles, es función del pH del agua:





# LIXIVIACIÓN BACTERIANA

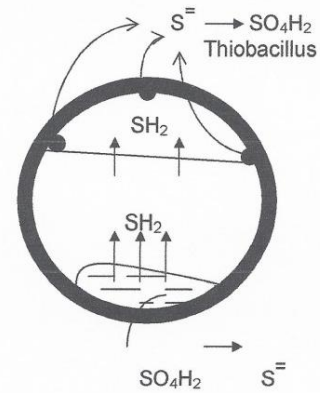
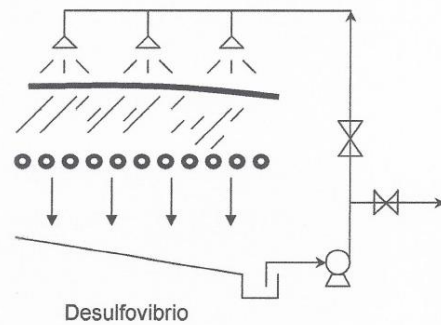
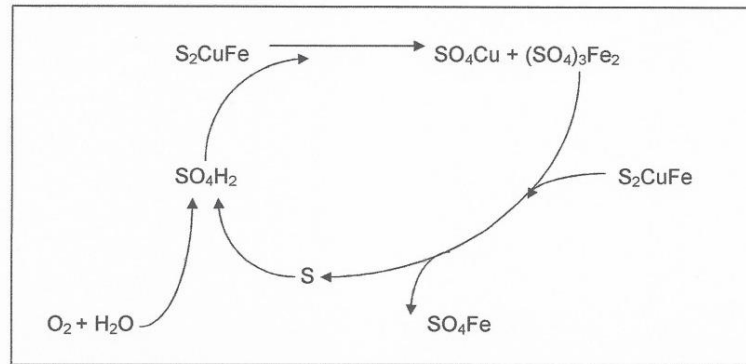
Cu, Au, U, Ag

Ejemplo Calcopirita  $S_2CuFe$

➤ Oxidación directa:



➤ Oxidación indirecta:



# Microorganismos y su ambiente

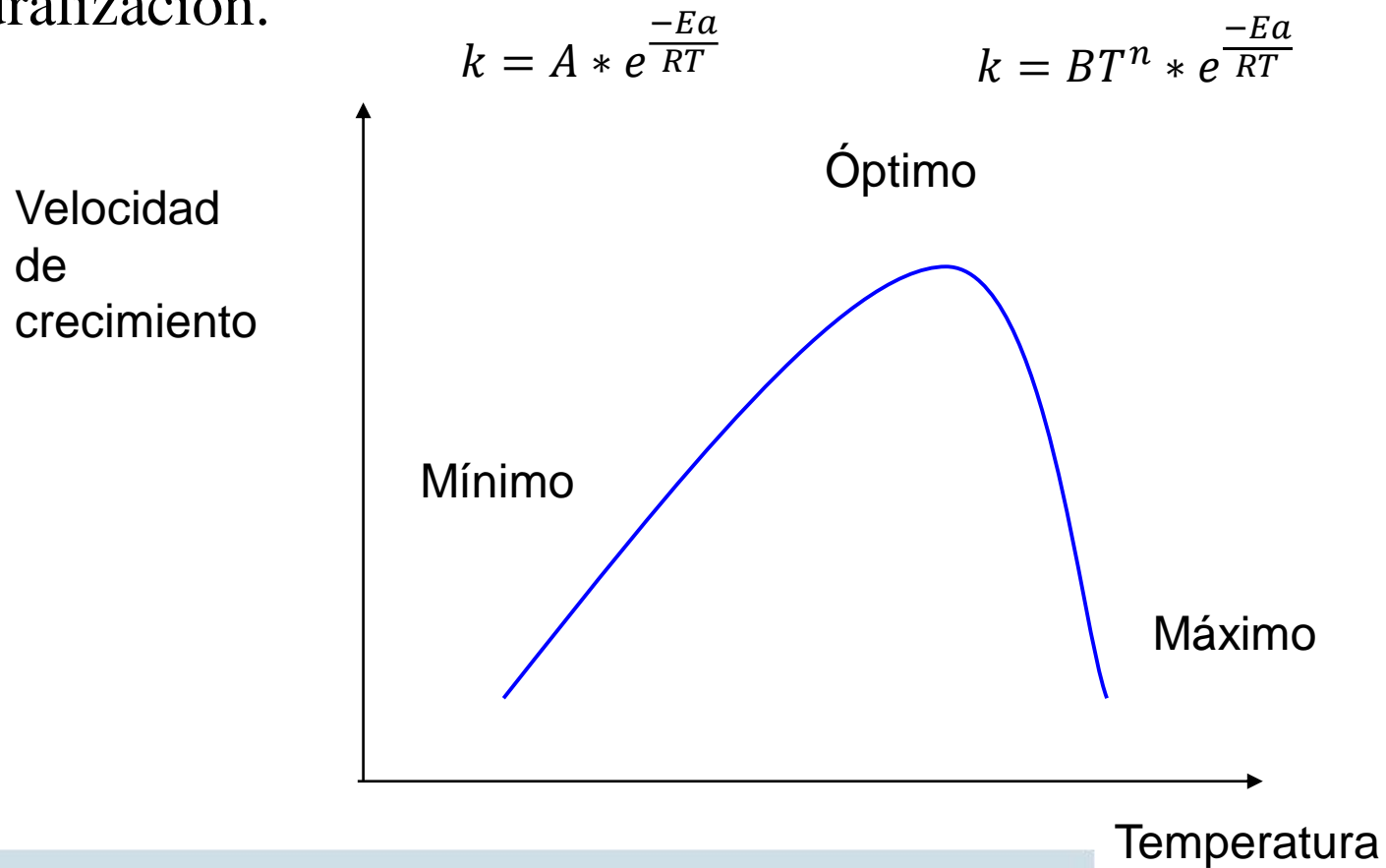
## Factores ambientales que afectan el crecimiento

- Temperatura
- PH
- Presión
- Potencial de oxidoreducción
- Radiación
  
- Presencia de compuestos inhibidores o tóxicos:  
salinidad, hidrocarburos, etc

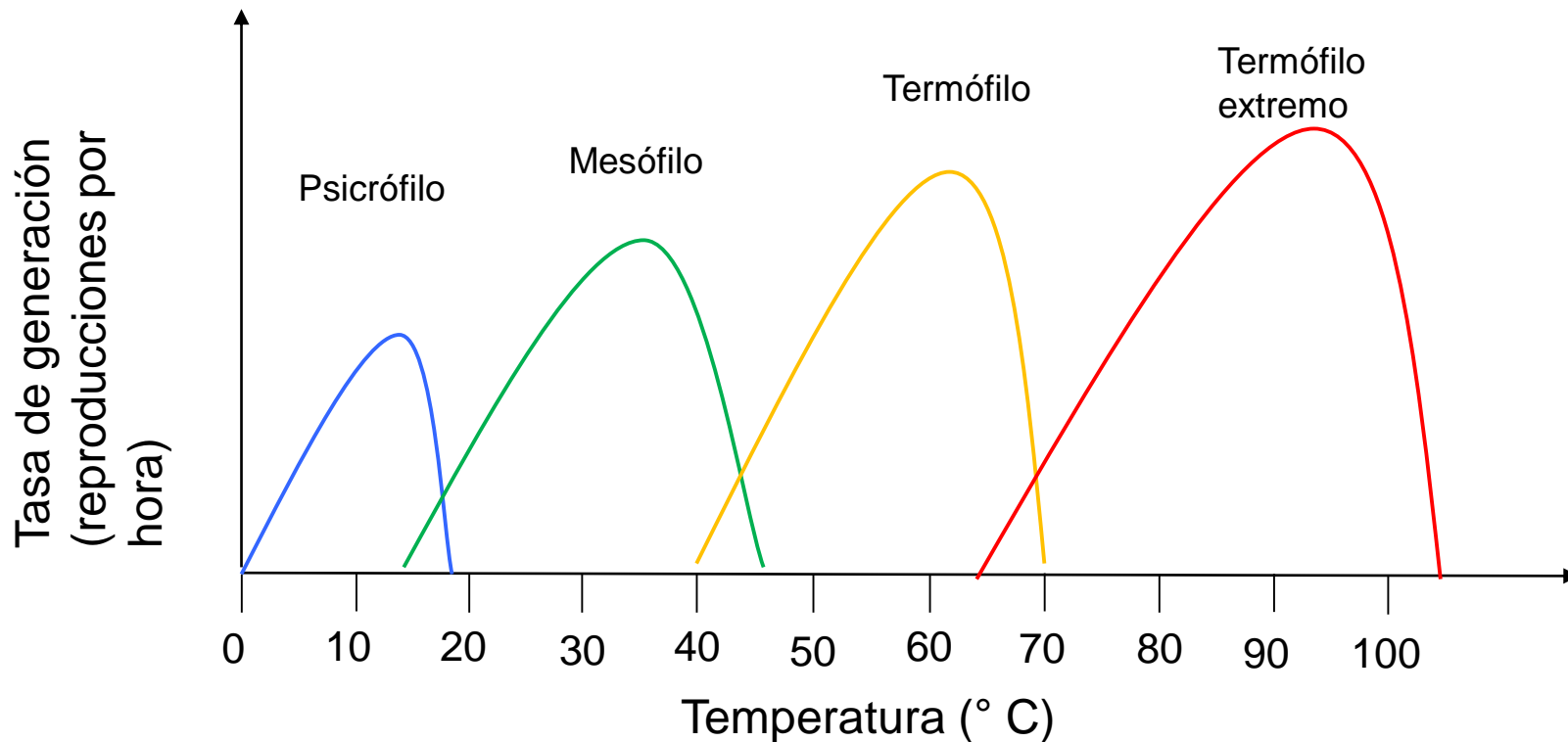


# Temperatura

- La temperatura afecta la actividad microbiana siguiendo la ley de Arrhenius, tanto para crecimiento y metabolismo como para desnaturalización.



# Temperatura



## Clasificación microbiana según temperatura óptima



**pH afecta:**  
solubilidad  
disponibilidad  
Actividad biológica

**Aumento  
solubilidad  
de metales**

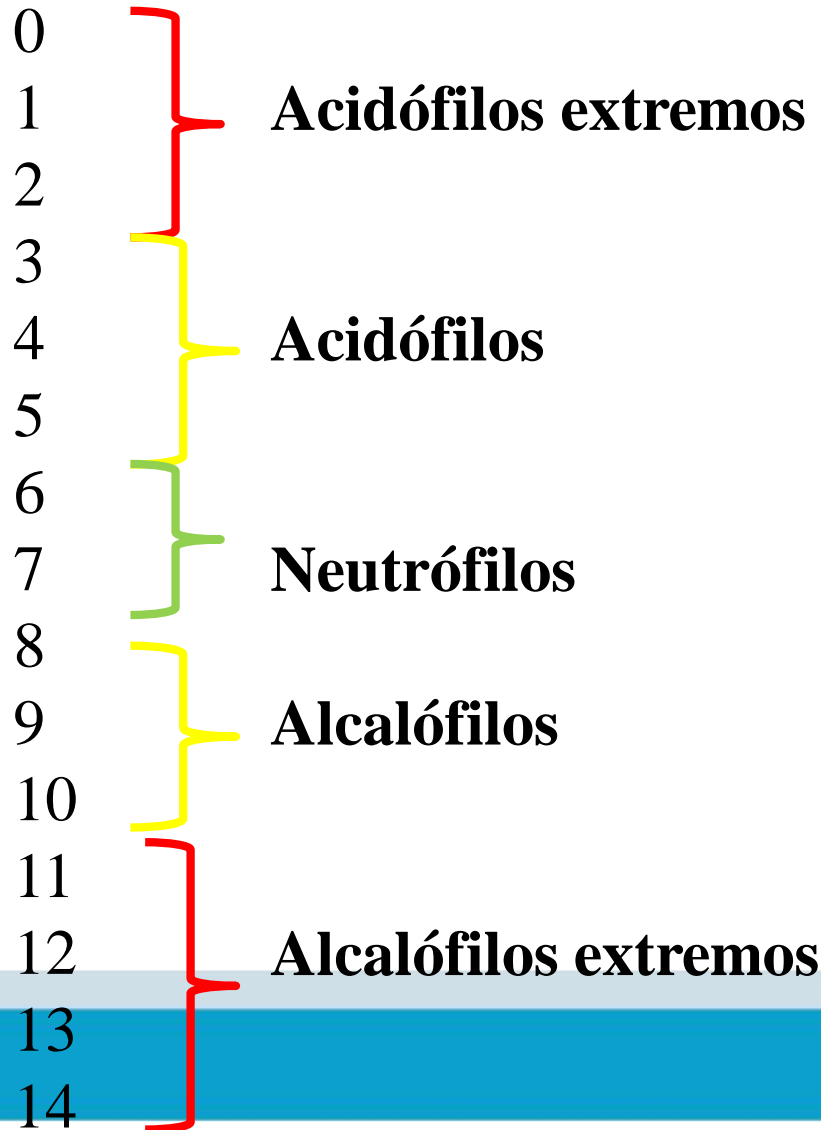
Muchos metales son insolubles a pH elevado. Elevando el pH del sistema de tratamiento se puede reducir el riesgo de envenenamiento de microorganismos

**Modificación del pH por los organismos**

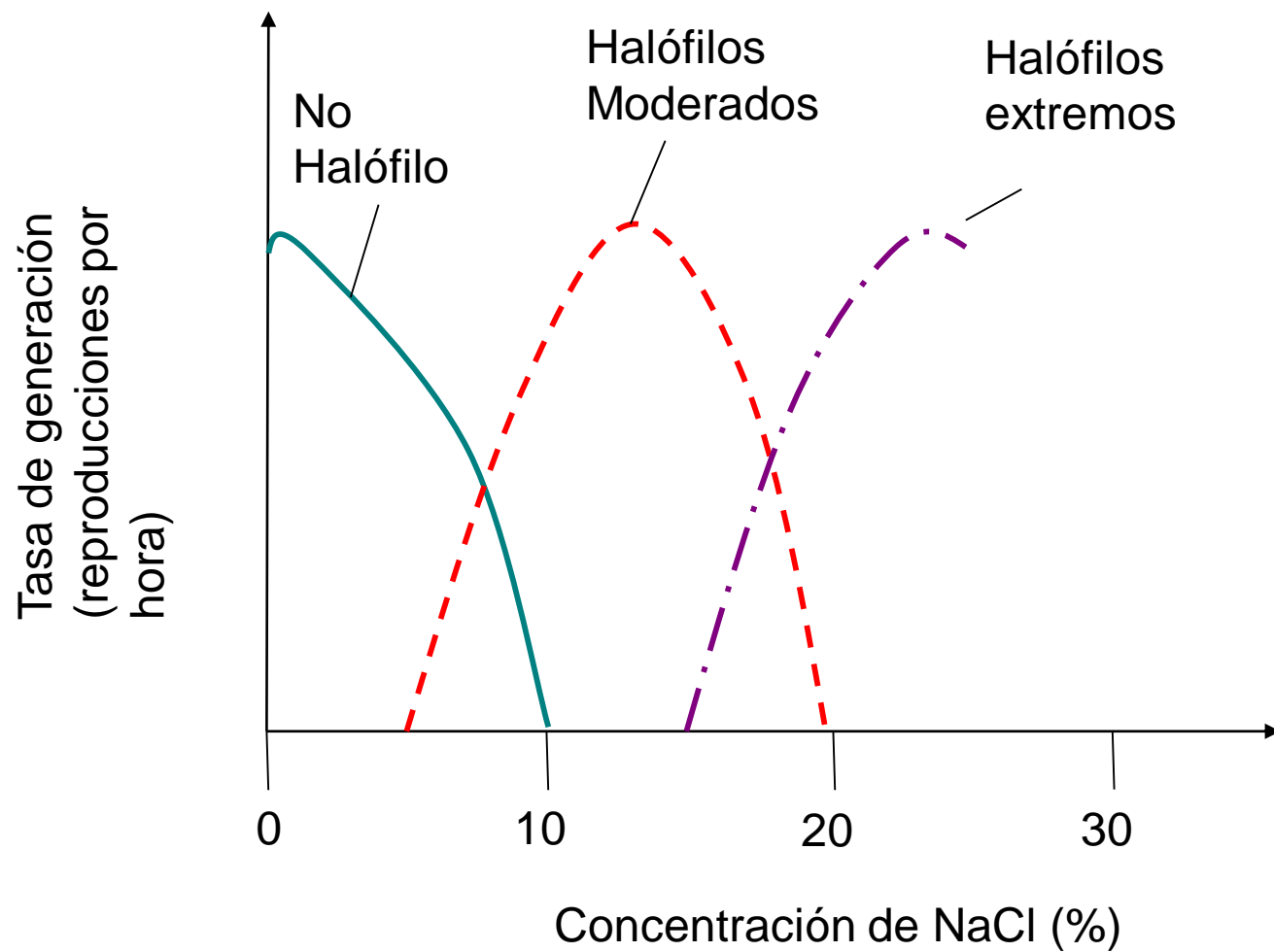


# Clasificación microbiana según pH

## Rango preferencial para vivir



## Influencia de la salinidad



## POTENCIAL DE ÓXIDORREDUCCIÓN

La base real de una reacción de oxidorreducción, donde se emplea una sustancia química aportada por compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de energía, es la transferencia de electrones. En términos energéticos el donador de electrones es una fuente energética.

El potencial de oxidorreducción, redox (Eh), en los ambientes oxidativos tienen potenciales positivos y en los reductores los tienen negativos. Una sustancia se reduce cuando recibe electrones del donador y la otra se oxida cuando los libera.

Una sustancia de menor potencial de oxidorreducción puede donar electrones a cualquier sustancia más oxidada que ella y recibirlos de una más reducida.

## PRESIÓN





# RADIACIÓN

RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UV), éste tipo de radiación es letal para los microorganismos.

La muerte de las células por la radiación UV es debida a su acción sobre el ADN (a 260 nm es altamente letal), esto es porque impide que se pueda realizar una réplica del ADN. Existen enzimas que intentan y pueden reparar el daño causado por la radiación UV, es reparada sólo cuando se la expone a la luz visible en el espectro de la luz azul, éste mecanismo es denominado fotorreactivación. Otras enzimas actúan en ausencia de luz

La radiación ejerce mayor efecto sobre las células húmedas que las secas, sobre las no pigmentadas que las pigmentadas, sobre las haploides o mononucleadas que las diploides o plurinucleadas.



**LUZ VISIBLE.** La luz visible de elevada intensidad puede causar la muerte celular, debido a un proceso denominado *fotooxidación*, en el cual la luz absorbida por los pigmentos de la célula causa la inactivación de los enzimas o de otros componentes sensibles cuando está presente el oxígeno.

**RADIACIÓN IONIZANTE.** Esta radiación no mata por afectar directamente a los constituyentes celulares, sino que induce indirectamente cambios al introducir en el medio radicales químicos activos (radicales libres). Éstos radicales libres pueden reaccionar con macromoléculas sensibles de la célula e inactivarlas.

La radiación ionizante puede actuar sobre todos los constituyentes celulares pero la muerte es producida por los efectos sobre el DNA. La inactivación de un gen crítico puede conducir a la muerte, mientras que la inactivación de células sueltas de proteínas no conduce a la muerte.



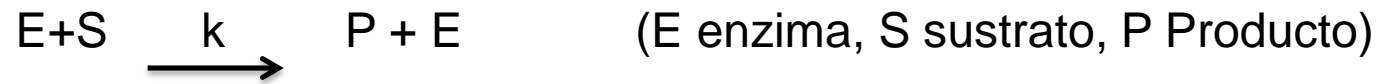
## CINÉTICA ENZIMÁTICA

*Estudio de la velocidad de reacciones catalizadas enzimáticamente*

La velocidad de una reacción catalizada por un enzima depende de

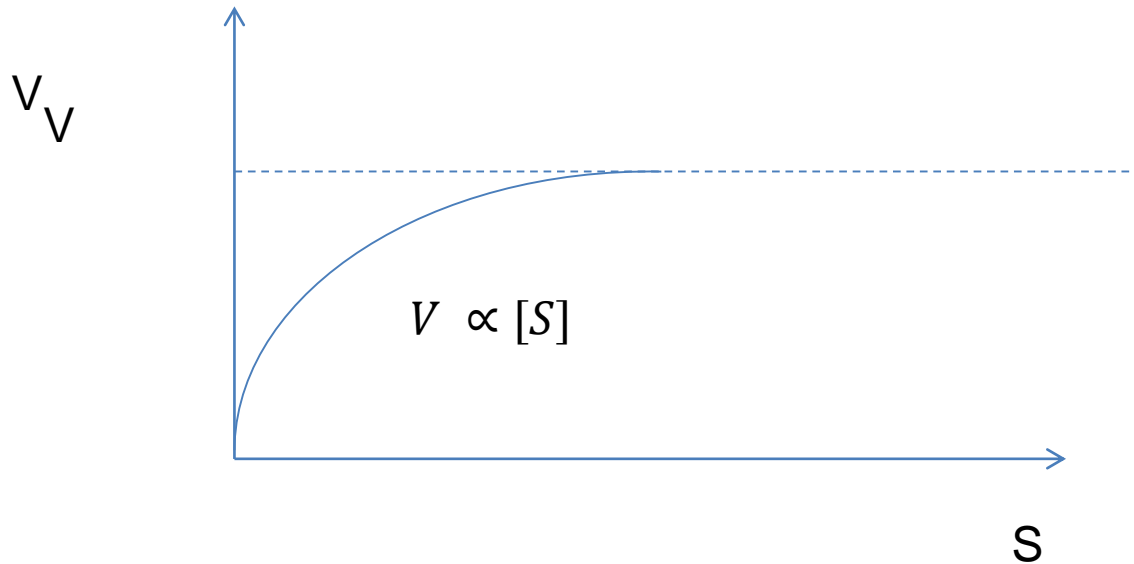
1. la concentración de moléculas de sustrato [S]
2. la temperatura
3. la presencia de inhibidores
4. pH del medio, que afecta a la conformación (estructura espacial) de la molécula enzimática





$$v = \frac{dS}{dt} = k[E][S]$$

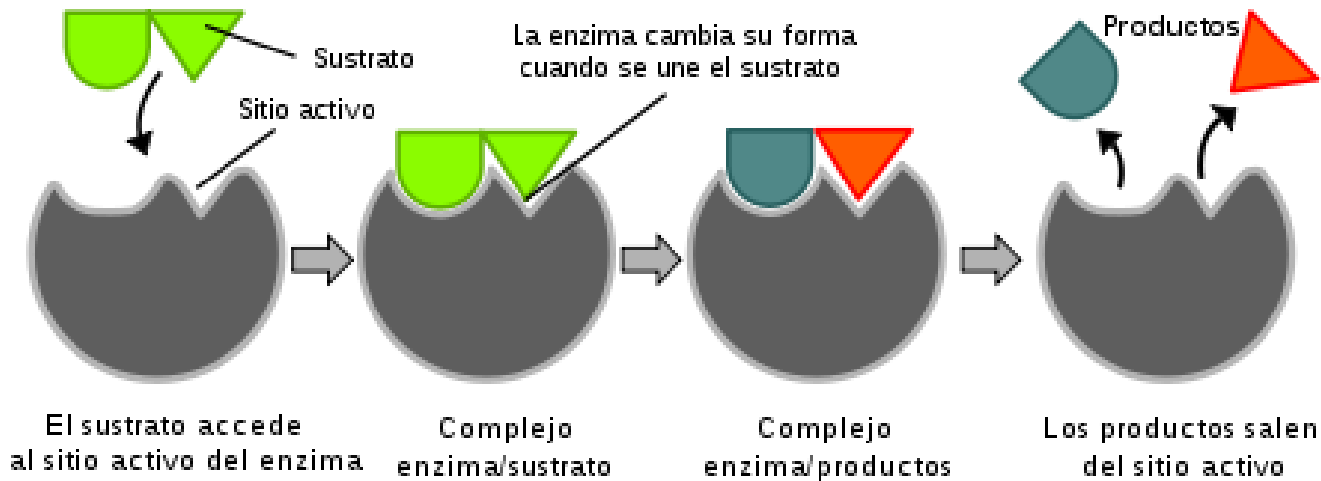
$$V \propto [S]$$



# MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

## Hipótesis básicas:

enzima y sustrato forman un complejo intermedio ES



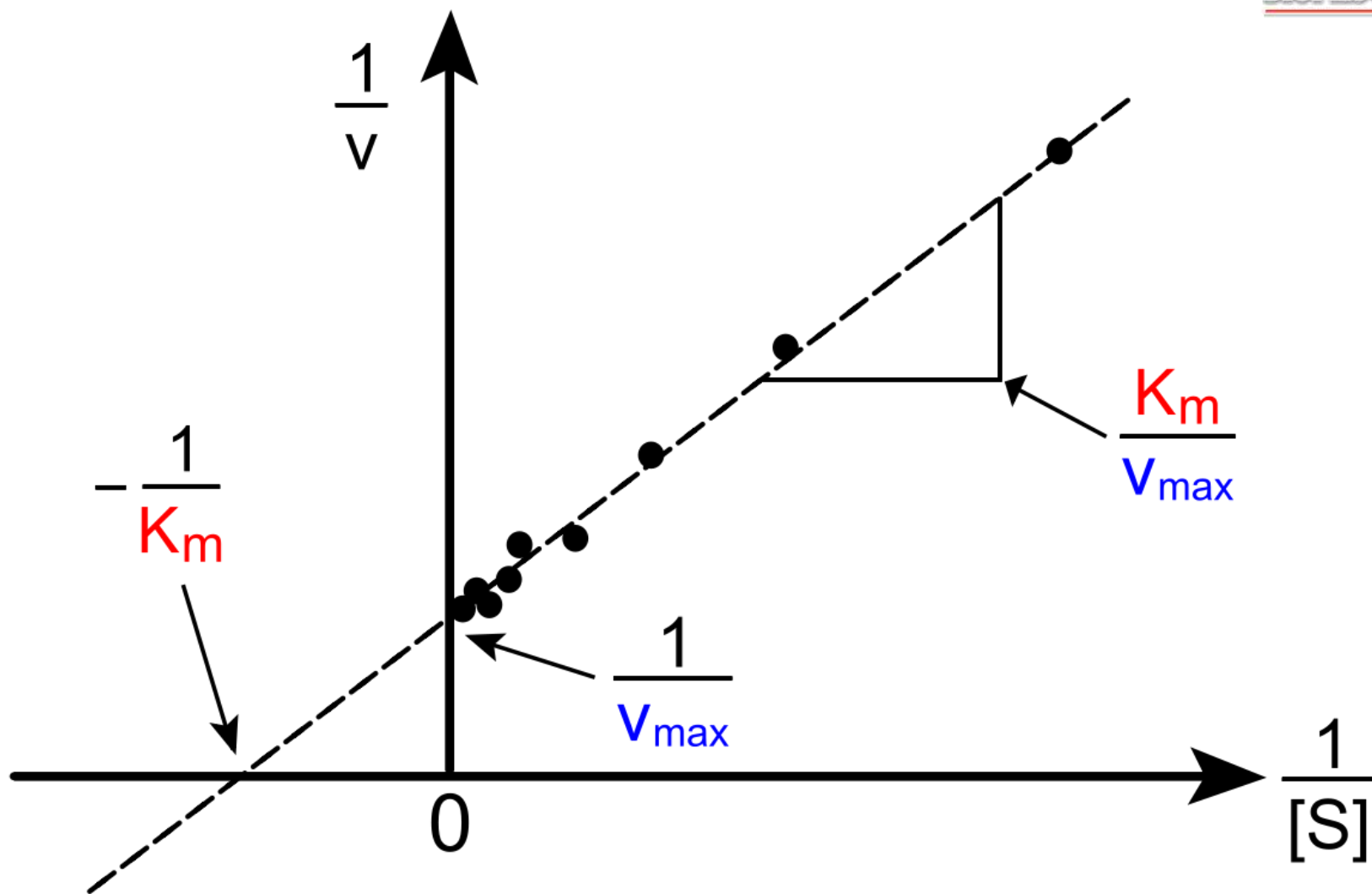
- $[E_0] = [E] + [ES] \equiv \text{constante}$
- el proceso  $ES \longrightarrow P+E$  es irreversible (concentración de producto pequeña)
- **Hipótesis cuasi-estacionaria:** después de una fase inicial transitoria, la concentración de las distintas formas enzimáticas (E,ES) no varía

$$v = \frac{V_{max} S}{K_m + S}$$



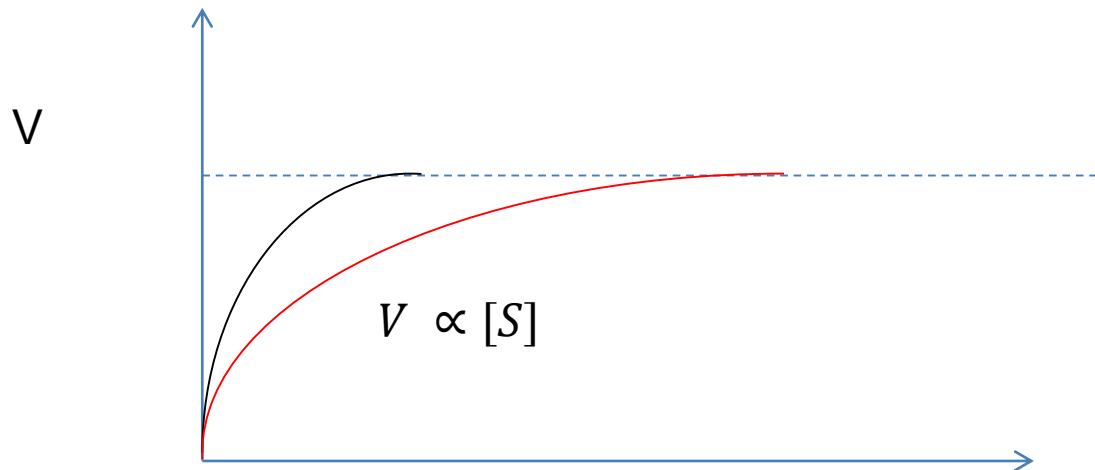
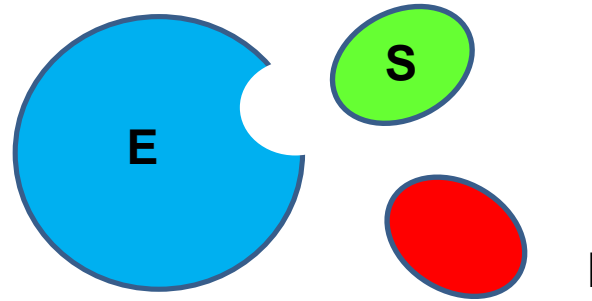
$$K_m = \frac{k_{-1} * k_2}{k_1}$$





**Inhibición enzimática:** moléculas diferentes del sustrato pueden unirse a la enzima reduciendo total o parcialmente su actividad catalítica. Estas moléculas reciben el nombre de **inhibidores**

Inhibidor competitivo

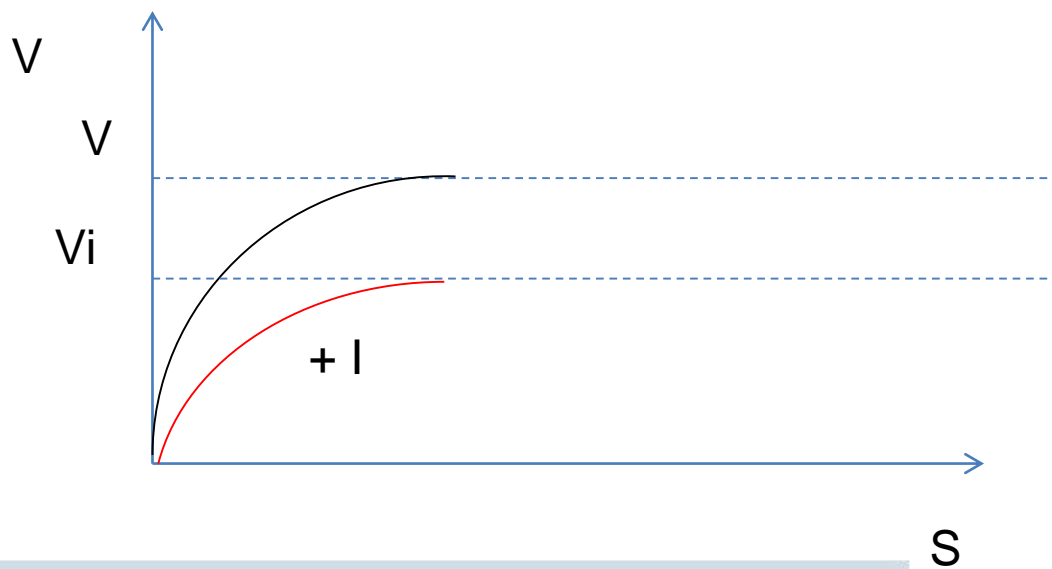
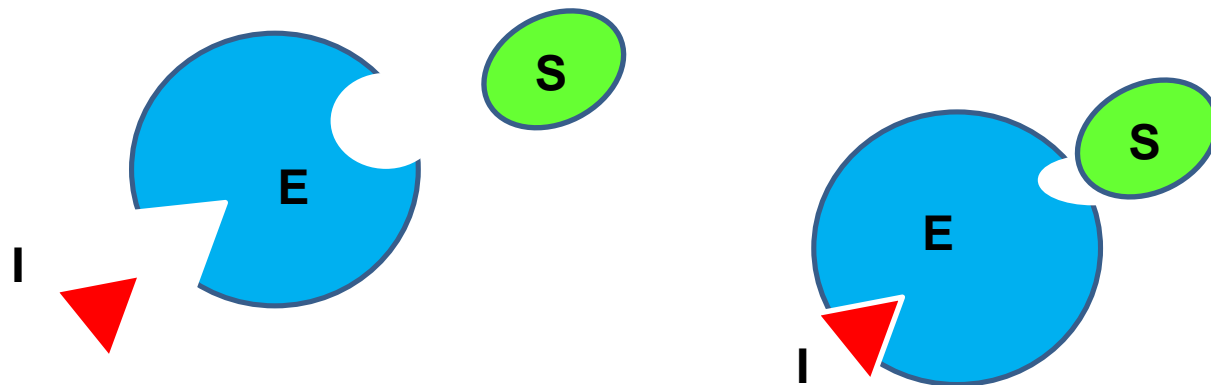


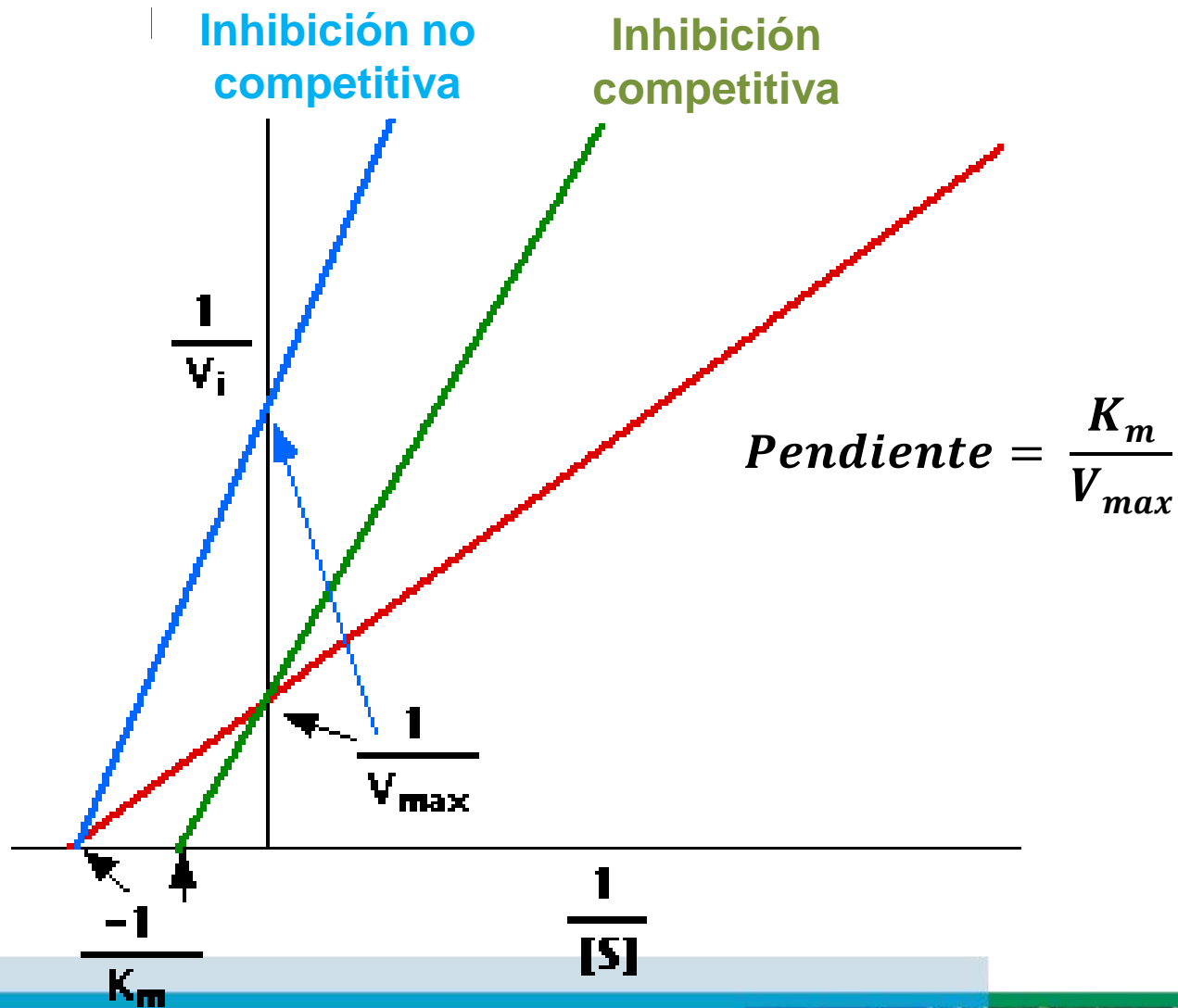
S





Inhibidor  
alostérico





## **REACTOR BIOLÓGICO**

**CONSTITUYE UN AMBIENTE MAS O MENOS CONFINADO DONDE SE MANTIENEN LAS CONDICIONES AMBIENTALES ADECUADAS PARA EL DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS Y LOS PROCESOS METABOLICOS REQUERIDOS PARA UNA BIOTRANSFORMACION DESEADA.**

**SE PUEDEN DIVIDIR EN TRES GRANDES GRUPOS:**

**\* FASE LIQUIDA**

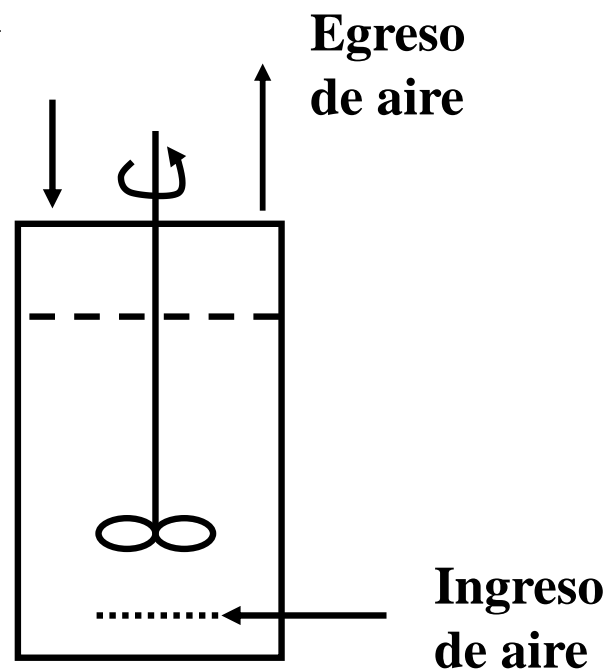
**\* FASE SOLIDA**

**\* FASE LODO**



# REACTOR DISCONTINUO

**Control de pH**



# **CINETICA MICROBIANA**

**SUSTRATO**

**BIOMASA**

**PRODUCTOS METABOLICOS**

**CRECIMIENTO MICROBIANO**

**SIN RESTRICCIONES AL DESARROLLO**

**SUSTRATO LIMITANTE**

**LIMITADO POR INHIBICION POR SUSTRATO O POR PRODUCTO**

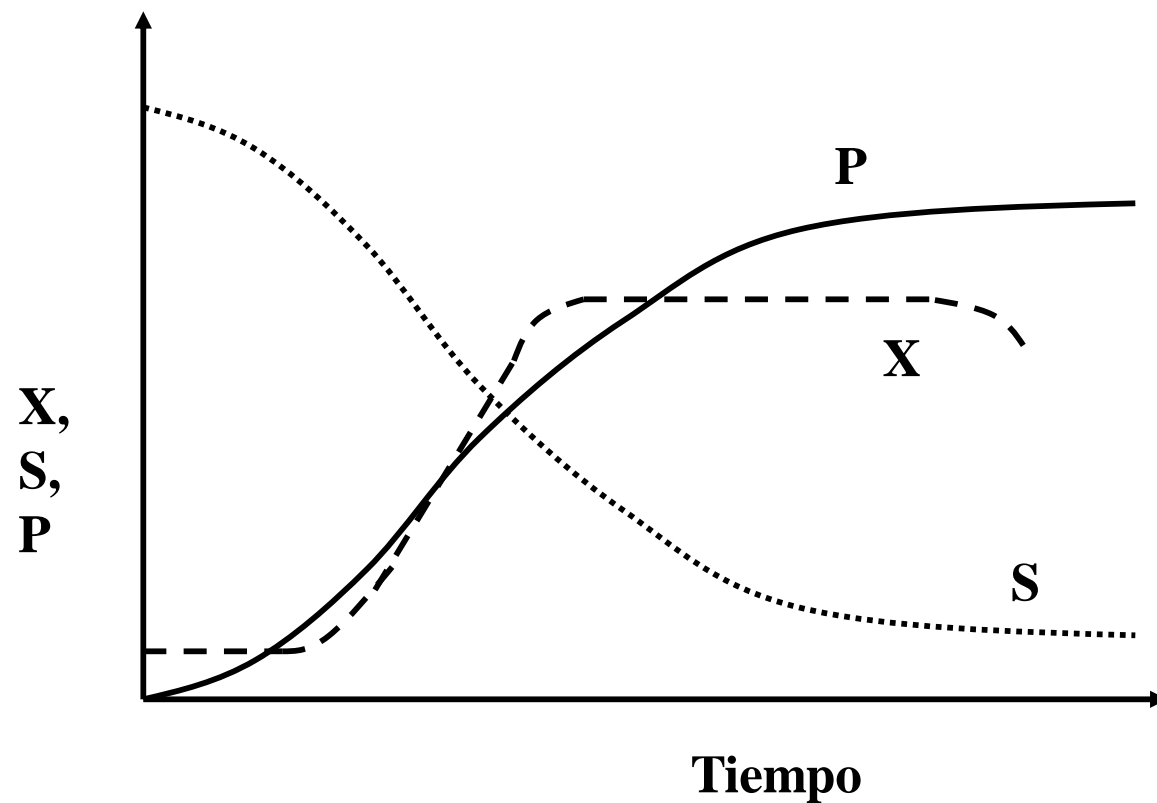
**LIMITADO POR TRANSFERENCIA DE MATERIA**



# Crecimiento Bacteriano



# Crecimiento Bacteriano



## Modelo de crecimiento sin inhibidor

$$dX/dt = r_g = \mu X$$

$$\mu = \mu_m S / (K_s + S) \quad \text{Monod}$$

$$dX/dt = \mu_m X S / (K_s + S)$$

$$Y = (dX/dt) / (dS/dt) \quad \text{Productividad}$$

$$dS/dt = \mu_m S / Y (K_s + S) = k S / (K_s + S)$$

$$k = \mu_m / Y$$

$$r_d = k_d X \quad \text{decrecimiento}$$

$$r' = r_g - r_d$$

$$r'_g = \mu_m X S / (K_s + S) - k_d X$$





Concentración mínima de sustrato

$$r'_g = \mu_m \frac{XS}{(K_s + S)} - k_d X = 0$$

$$\mu_m \frac{XS}{(K_s + S)} = k_d X$$

$$\mu_m \frac{XS_{\min}}{K_s} = k_d X$$

$$S_{\min} = k_d K_s / \mu_m$$

$S_{\min} = 0,1$  a  $1,0$  mg/l en sistemas aerobios

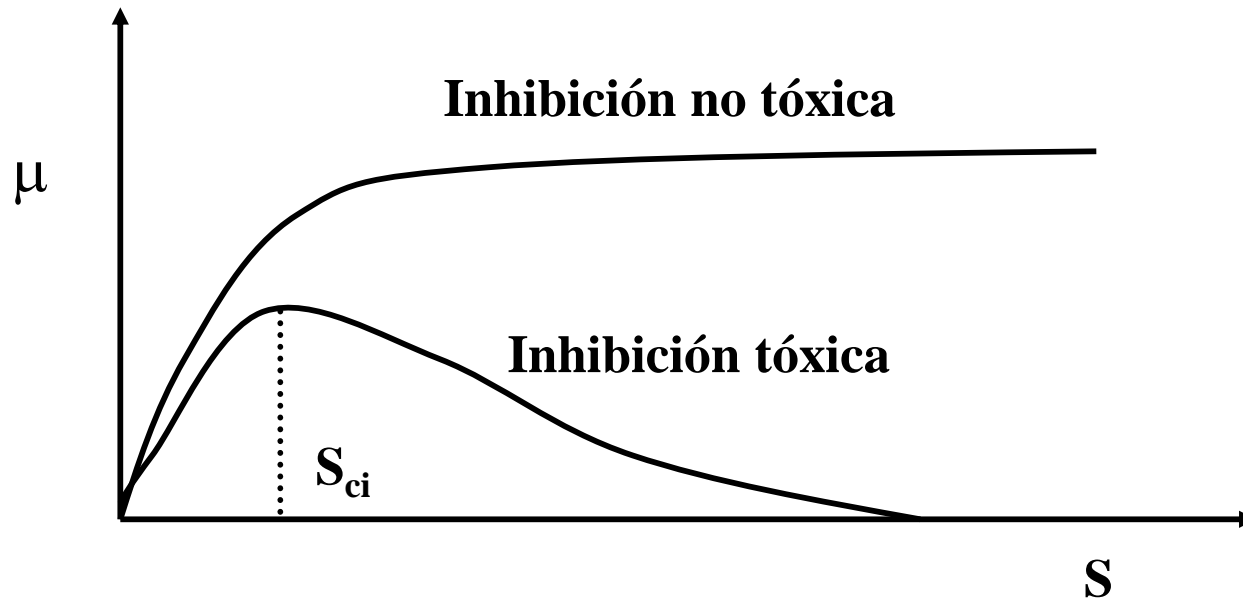
$0,01$  en sistemas anaerobios

Si  $S < S_{\min}$  pero  $S >$  regulación ambiental  $\longrightarrow$  cometabolismo



Cuando hay un inhibidor: ecuación de Andrews

$$dS/dt = \mu_m S/Y(K_s + S + S^2/K_i)$$

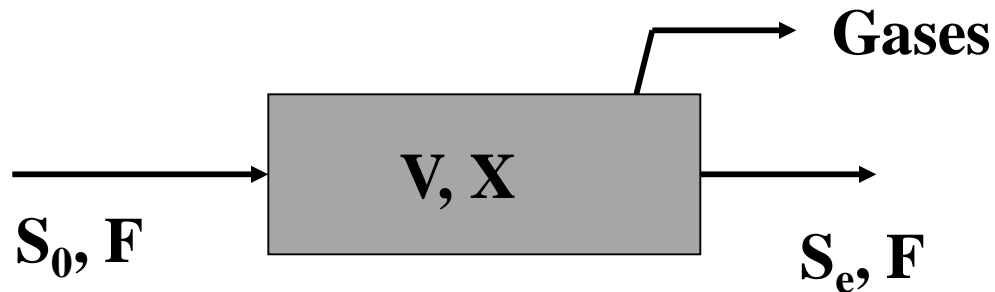


$$S_{cr} \longrightarrow d(dS/dt)/dS = 0$$

$$S_{cr} = (K_s/K_i)^{1/2}$$



## REACTOR CONTINUO



**Balance de masa**

**Acumulación = Entrada + crecimiento - salida**

$$V(dX/dt) = FX_0 - FX + Vr'_g$$

$$V(dX/dt) = FX_0 - FX + Vr'_g$$



$$V(dX/dt) = FX_0 - FX + V (\mu_m X S / (K_s + S) - k_d X)$$

$$dX/dt = (F/V)X_0 - (F/V)X + (\mu_m XS / (K_s + S) - k_d X)$$

$$dX/dt = DX_0 - DX + (\mu_m XS / (K_s + S) - k_d X)$$

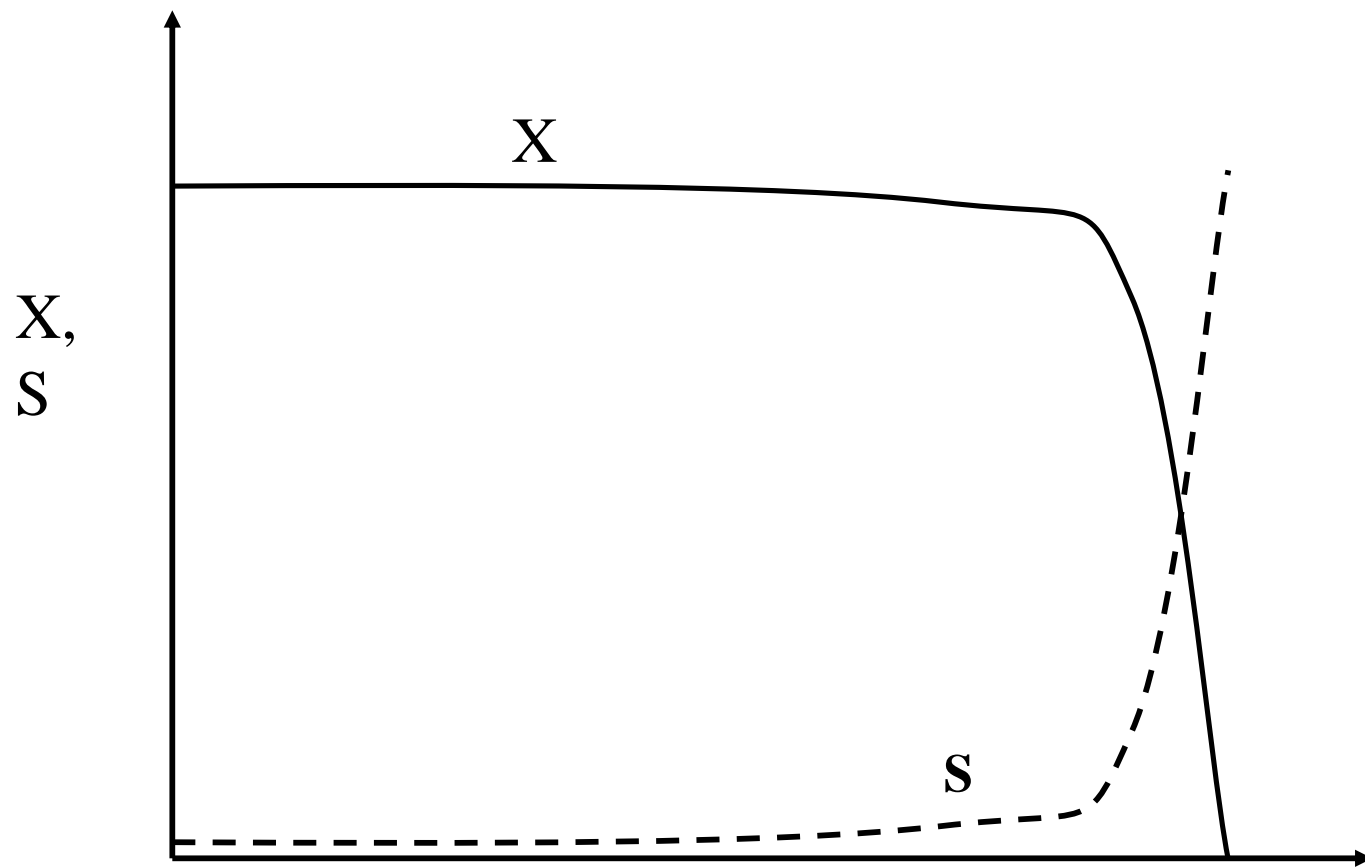
$$X_0 = 0, \quad dX/dt = 0$$

$$dX/dt = (\mu_m S / (K_s + S) - k_d)X - DX = 0$$

$$D = (\mu_m S_e / (K_s + S_e)) - k_d = \mu$$

Si  $D > \mu \longrightarrow$  wash out





**D**



## FENÓMENOS DE TRANSPORTE

### Etapas que controlan la velocidad

Ocho resistencias son posibles en la vía de transferencia de masa, para el suministro y utilización de nutrientes y para la secreción y eliminación de metabolitos en fase líquida es:

La película gaseosa

En la interfase gas – líquido

en la película que rodea al gas

en la masa líquida

en la película líquida que rodea al sólido

en la interfase líquido – sólido

en la fase sólida que contiene o que es la célula

en los sitios de las reacciones bioquímicas



debe notarse que todos éstos obstáculos son puramente físicos, excepto el último que puede tener sus propias complejidades biológicas.

La fase continua puede ser líquida o sólida, mientras que la fase dispersa puede ser sólida, líquida o gaseosa.

Generalmente en los biorreactores la fase líquida acuosa es quien controla la velocidad:

Resistencia **interparticular**, interfase gas – líquido y resistencia de la fase líquida en la masa del medio acuoso que separa las fases dispersas.

Resistencias **intraparticulares**, cerca de la interfase sólido – líquido (puede ser significativa por la diferencia de densidad entre el medio acuoso y continuo), una resistencia de la fase líquida dentro de la sólida dispersa



## Coeficiente de transferencia de masa

$$N_a = k_L a (C_g^* - C_L)$$

$C_L$  : concentración del gas disuelto en la masa líquida en cualquier momento  $t$

$C_g^*$  : concentración del gas en la interfase gas – líquido a tiempo infinito

$k_L$  : coeficiente de transferencia local de masa de la fase líquida

$a$  : área de la interfase





# BIODISPONIBILIDAD

**LA DEGRADACION DE UN CONTAMINANTE EN SUELO DEPENDE DE UNA SERIE DE FACTORES, ENTRE ELLOS:**

- **ACTIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS**
- **TRANSFERENCIA DE MASA DESDE EL SUELO HASTA EL MICROORGANISMO**

**EN ESTUDIOS DE CAMPO, EN MUCHOS CASOS, EL INCREMENTO DE LA CAPACIDAD DE LOS MICROORGANISMOS NO CONDUCE A UN AUMENTO DE LA VELOCIDAD DE DEGRADACION.**

**ESTE HECHO ES AUN MAS EVIDENTE EN DERRAMES O CONTAMINACIONES ANTIGUAS. HAY EXPERIMENTOS DE CAMPO EN DONDE SE INCORPORO EL CONTAMINANTE FRESCO Y FUE INMEDIATAMENTE DEGRADADO POR LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL SUELO**



# DISMINUCION DE LA BIODISPONIBILIDAD

**LA REDUCCION DE LA BIODISPONIBILIDAD EN EL TIEMPO SE LLAMA ENVEJECIMIENTO (AGEING O WEATHERING). LAS CAUSAS PUEDEN SER:**

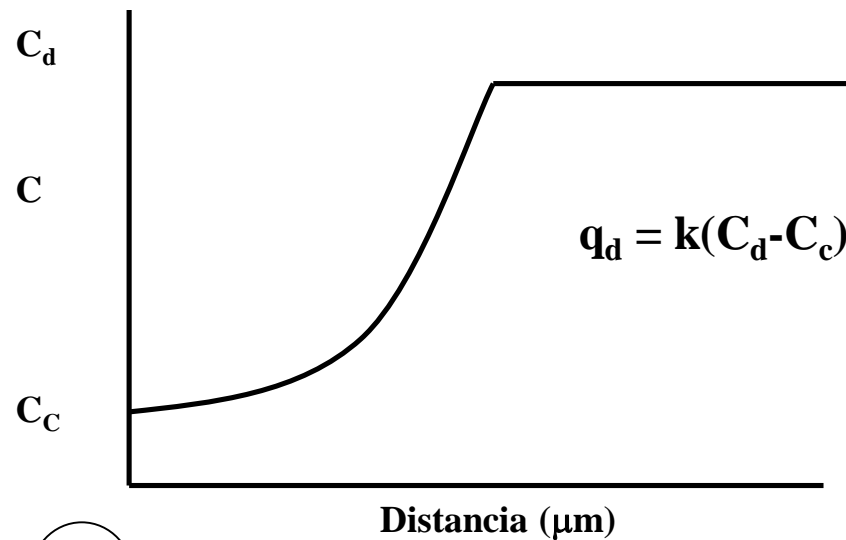
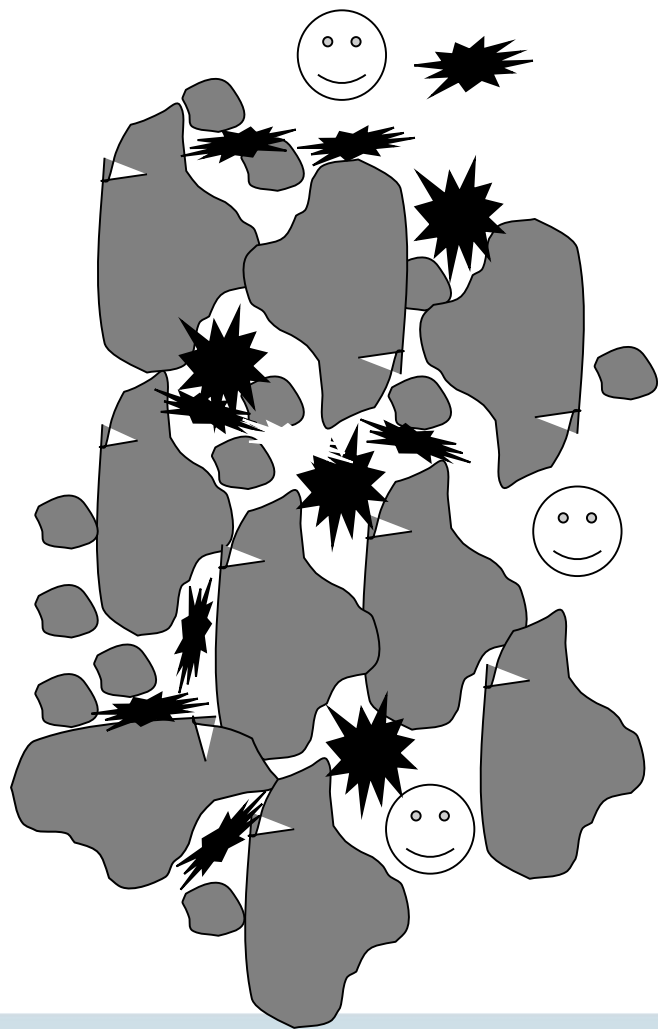
- **REACCIONES DE OXIDACION QUIMICA QUE INCORPORAN EL CONTAMINANTE DENTRO DE LA MATERIA ORGANICA**
- **DIFUSION LENTA DENTRO DE LOS POROS MUY PEQUEÑOS Y ADSORCION EN LAS PAREDES DE LOS MISMOS**
- **FORMACION DE PELICULAS SEMIRIGIDAS ALREDEDOR DE LOS LIQUIDOS EN FASE NO ACUOSA CON UNA ALTA RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE MASA EN ACUIFEROS Y REACTORES SLURRY**



# DISTRIBUCION MICROSCOPICA DE MICROORGANISMOS Y CONTAMINANTES EN EL SUELO

- LA DISTANCIA ENTRE COLONIAS DE MAS DE 100 INDIVIDUOS PUEDE SER DE 100  $\mu\text{m}$ .
- LAS BACTERIAS PUEDEN VIVIR EN POROS CON TAMAÑOS DE 0,8 A 3  $\mu\text{m}$
- LOS CONTAMINANTES PUEDEN INTRODUCIRSE EN POROS CON DIMENSIONES  $\ll 1 \mu\text{m}$  EN DONDE LOS MICROORGANISMOS NO PUEDEN ACCEDER. ESTOS CONTAMINANTES PUEDEN ESTAR COMO LIQUIDOS O SOLIDOS





$$q_c = q_{\max} \frac{C_c}{(K_m + C_c)}$$



## MECANISMO DE TRANSFERENCIA DE MASA

## EXPRESIÓN

Difusión lineal

$$D_{\text{eff}} A / \delta$$

difusión radial sin flujo advectivo

$$D_{\text{eff}} 4\pi R(R + \delta) / \delta$$

difusión radial ( $\delta \gg R$ )

$$D_{\text{eff}} 4\pi R$$

cinética de disolución

$$k_d A_{\text{sw}}$$

flujo advectivo, monocapa de células sobre  
las partículas con capa de difusión alrededor  
de ellas

$$\eta A_p U / n$$

