

CAPITULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Problemática de la contaminación ambiental

En la actualidad nuestro mundo está sufriendo muchos cambios debido a la acción del hombre, cambios que de alguna manera u otra desequilibran las condiciones ambientales preexistentes. El aumento continuo de la población, su concentración progresiva en grandes centros urbanos y el desarrollo industrial ocasionan, día a día, más problemas al medio ambiente.

El desarrollo de técnicas analíticas más sensibles y confiables puso en evidencia un grado de contaminación ambiental anteriormente desconocido alertando y creando conciencia en la sociedad sobre este problema. La acumulación de productos y residuos, algunos de ellos tóxicos, se ha agudizado por el desarrollo acelerado de una industria extractiva y de manufactura demandada por una creciente necesidad de bienes de consumo, así como por la necesidad de generar suministros agrícolas cada vez mayores. El impacto de la contaminación ambiental sobre las poblaciones más sensibles ha promovido la creación de una legislación para el manejo y tratamiento de residuos y el surgimiento de asociaciones ambientalistas (Yeomans y col., 2004).

2.1.1 Tipos de contaminantes

La contaminación se manifiesta como la presencia de sustancias extrañas de origen humano (basura, pesticidas, aguas residuales) en el medio ambiente, ocasionando alteraciones en la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas. Los causantes o contaminantes pueden ser químicos que se refieren a compuestos provenientes de la industria química. Estos pueden ser sustancias de efectos perjudiciales muy marcados,

como metales pesados (compuestos de fierro, cobre, zinc, mercurio, plomo, cadmio), ácidos (sulfúrico, nítrico, clorhídrico), álcalis (potasa, soda cáustica), disolventes orgánicos (acetona), detergentes, plásticos, derivados del petróleo (gasolina, aceites, colorantes, diesel), pesticidas (insecticidas, fungicidas, herbicidas), detergentes y abonos sintéticos (nitratos, fosfatos). Otro tipo de contaminantes son los físicos y biológicos, como son los emisores de radiación ionizante y agentes patógenos.

2.1.2 Formas de contaminación

La contaminación se manifiesta de diversas formas tales como la del suelo causada por plaguicidas, abonos sintéticos, petróleo y sus derivados, basuras, etc. La contaminación que afecta a los alimentos es originada por la presencia de sustancias riesgosas o tóxicas para la salud de los consumidores, generada durante la producción, manipulación, transporte, industrialización y el consumo de alimentos.

La contaminación agrícola es originada por desechos sólidos, líquidos o gaseosos de las actividades agropecuarias; pertenecen a este grupo los plaguicidas, fertilizantes, desechos de establos, la erosión, el polvo del arado, el estiércol, los cadáveres entre otros.

Con frecuencia se descubren nuevas formas y fuentes de contaminación, que afectan al ambiente y a la salud. En la era moderna y con el desarrollo de nuevas tecnologías y productos surgen nuevas fuentes contaminantes, que al inicio parecen inofensivos, y luego se demuestra que ocasionan daños a la salud física o mental de las personas o al ambiente (extinción de especies y degradación de recursos básicos como agua, suelo, bosques, etc.).

2.2 Contaminación con plaguicidas

Los plaguicidas son considerados como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal. (SEMARNAP, 1999).

Estos son manufacturados y dispersados en el ambiente contaminándolo. Esta contaminación se puede dar por distintas causas: aplicaciones directas en cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados y dispuestos en el suelo (Ortiz y col., 2001). Los plaguicidas desde su descubrimiento y fabricación han jugado un papel primordial en el desarrollo agrícola a través del control de insectos, hongos, hierbas y demás plagas que merman la producción de los cultivos. También han contribuido al control de enfermedades transmitidas por vectores biológicos como el paludismo, dengue y tifo, entre otras (Ortiz y col., 1997).

Sin dejar de tomar en cuenta los beneficios que el uso de plaguicida ha generado, considerando que en los países en desarrollo más del 60 % de la población económicamente activa depende de la agricultura, no se puede negar el impacto que estos están ejerciendo sobre suelos y cuerpos de agua superficiales y subterráneos incrementando el riesgo de las especies sensibles expuestas, sobre todo el hombre donde se pueden manifestar efectos toxicológicos agudos y crónicos de este tipo de compuestos (Cebrián, 1998). Esta plenamente documentado los efectos tóxicos agudos de los plaguicidas organofosforados y carbamatos sobre el sistema nervioso al inhibir la enzima colinesterasa, esencial para la adecuada conducción del impulso nervioso, lo que se traduce en alteraciones que van desde leves hasta graves e inclusive la muerte (Ecobichon, 1996). Otros, como piretroides, organofosforados y organoclorados tienen efecto genotóxico crónico, alterando la función reproductiva de las especies e inclusive hay evidencias de carcinogenicidad de plaguicidas como amitrol, clordano, DDT,

heptaclor, clorofenoles, bromuro de etilo, óxido de etileno, mirex y toxafeno. Se ha asociado cáncer de ovario a exposición de herbicidas triazínicos; cáncer mamario diversos plaguicidas; cáncer pancreático y DDT, entre otros (McConell, 1993). De igual forma se han reportado anomalías en el sistema reproductivo y endocrino de la vida silvestre de ecosistemas impactados por plaguicidas.

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud cada año entre 500,000 y 1 millón de personas se intoxican con plaguicidas y entre 5,000 y 20,000 mueren. Al menos la mitad de los intoxicados y el 75% de los que fallecen son trabajadores agrícolas, el resto se debe a envenenamientos por consumo de alimentos contaminados. En total, entre los dos grupos la mortalidad alcanza la cifra de 220 mil defunciones al año (OMS, 1990; Eddleston y col., 2002).

La Red Internacional de Acción Contra el Uso de Plaguicidas informa que los países en vías de desarrollo utilizan la quinta parte del consumo mundial de estos compuestos y se estima que la verdadera cifra de intoxicaciones por dichas sustancias asciende a 25 millones de casos, siendo el 99% de las defunciones atribuibles a los plaguicidas en estos países (PAN Internacional 1990).

2.3 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados son ésteres derivados del ácido fosfórico, originados por la sustitución de los grupos OH por grupos OR (donde R corresponde a grupos alquilo; También el grupo P=O del ácido puede ser sustituido por el grupo P=S; los grupos OR por grupos S-R (donde R y S corresponden a grupos alquilo y sulfhidrilo respectivamente) así como otras sustituciones adicionales como halógenos o NH₂ (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007; Ortiz y col., 1997).

En el hombre actúan sobre el sistema nervioso central, inhibiendo la acetilcolinesterasa, enzima que modula la cantidad y los niveles del neurotransmisor acetilcolina,

interrumpiendo el impulso nervioso por fosforilación del grupo hidroxilo de serina en el sitio activo de la enzima. Los compuestos órgano-fosforados inhiben la acción de la colinesterasa y por tanto se acumulan niveles exagerados de acetilcolina que producen funciones anormales del sistema nervioso y que producen la muerte (Martínez–Valenzuela y Gómez–Arroyo, 2007).

Los síntomas que causan son pérdida de reflejos, dolor de cabeza, mareos, náuseas; muy altas dosis puede resultar en pérdida de consciencia, incontinencia, convulsiones, coma y hasta la muerte. Las personas con enfermedades respiratorias, exposición reciente a inhibidores de la colinesterasa, deterioro y mal funcionamiento del hígado tienen un mayor riesgo de exposición al metil paratión (EXTOXNET, 1996).

Asimismo se ha descrito que tienen propiedades alquilantes (Martínez–Valenzuela y Gómez–Arroyo, 2007), lo cual desde el punto de vista de la mutagénesis es de suma importancia, puesto que actúan directamente sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) añadiendo grupos alquilo principalmente metilo y etilo a las bases nitrogenadas que tienen grupos nucleofílicos capaces de reaccionar con electrofílicos (Wild, 1975). Los compuestos organofosforados son los más utilizados en la agricultura, la mayoría son insecticidas y también acaricidas, su forma de ingreso a estos organismos es por ingestión y por contacto. Se utilizan en cultivos de hortalizas, árboles frutales, granos, algodón, caña de azúcar, entre otros. Entre los diversos grupos de plaguicidas que son usados mundialmente, el grupo de los organofosforados es el mayor y más usado representando más del 36% del total del mercado mundial de plaguicidas (Kanekar y col., 2004).

2.3.1 Metil paratión

El metil paratión (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenil fosforotioato) es un insecticida altamente tóxico, muy utilizado principalmente en agricultura para el control de plagas de insectos; según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en

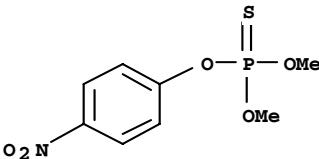
inglés) tiene una toxicidad de clase I y es de contacto e ingestión. Su uso es restringido y para su aplicación es necesario personal certificado; además, al estar incluido dentro de las listas de residuos peligrosos de la EPA cualquier producto que contenga metil paratión debe de estar etiquetado con la leyenda “peligroso”. De acuerdo a CICOPLAFEST (1997), es extremadamente peligroso para animales de sangre caliente (como mamíferos y aves). En México se ha recomendado para más de 70 cultivos, incluyendo vegetales, algunas plantas frutales y cereales. Además este tipo de plaguicida es utilizado en baños de ganado y las aguas residuales se dispersan sin previo tratamiento (Ortiz y col., 2001).

El metil paratión es de baja persistencia en el suelo, medio ambiente, con un tiempo de vida media de 1 a 30 días. La velocidad de degradación se incrementa con la temperatura y exposición a la luz del sol. El metil paratión es moderadamente adsorbido por la mayoría de los suelos y es ligeramente soluble en agua, donde puede sufrir fotólisis con una vida media de 8 días en verano y 38 días en invierno. Cuando hay grandes concentraciones de metil paratión en el suelo, o en derrames accidentales, la degradación se producirá sólo después de muchos años, con la fotólisis como ruta de degradación dominante (EXTOXNET, 1996).

2.3.1.1 Características fisicoquímicas

El metil paratión puro (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenil fosforotioato) es un sólido cristalino incoloro. El producto técnico es de un color café claro a café rojizo, con alrededor de un 80% de pureza. Es disponible en el mercado en forma de polvo, concentrado emulsificable, líquido y como formulación en polvo humidificable. Su formula y características fisicoquímicas se aprecian en la tabla 1.

Tabla 1. Principales características fisicoquímicas del metil paratión.

Nombre químico	(<i>O,O</i> -dimetil- <i>O-p</i> -nitrofenil fosforotioato)
* Estructura química	
Peso molecular	263.21
Solubilidad en agua	55-60 mg/L a 25° C
Punto de fusión	35-36° C
Presión vapor	1.3 mPa a 20° C
Coeficiente de partición	3.5185-3.8388
Coeficiente de adsorción	5100
Solubilidad en otros solventes	Soluble en diclorometano, 2-propanol, tolueno y la mayoría de disolventes orgánicos; insoluble en n-hexano.

Fuentes: EXTOWNET, 1996; * Merck Index, 1989

2.3.1.2 Toxicidad

El metil paratión es altamente toxico vía oral, así como también vía cutánea. Efectos agudos asociados con la exposición al metil paratión son similares a aquellos asociados con la exposición a otros plaguicidas organofosforados previamente descritos.

Efectos ecológicos: el metil paratión es muy tóxico para aves, moderadamente tóxico para los peces y los animales que comen pescado; también se ha reportado toxicidad hacia las abejas (EXTOXNET, 1996).

2.4 Contaminación regional de organofosforados (OP)

Históricamente el uso de plaguicidas se ha concentrado en los estados del noroeste del país, en donde prevalece la agricultura dedicada a los cultivos de exportación.

Para esto se han tenido que incorporar avances tecnológicos que permitan que sus productos puedan seguir siendo competitivos y aceptados en otros países. La sustitución de plaguicidas persistentes por no persistentes, ha dado por resultado un mayor riesgo inmediato para los jornaleros (Albert, 2004).

Según los datos disponibles, actualmente las regiones con mayor uso de plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco-Nayarit-Colima, Sonora-Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México y Puebla-Oaxaca. Se calcula que en ellas se aplica el 80 % de total de plaguicidas usados en el país, lo que comprueba que el uso de plaguicidas tiene una fuerte concentración en algunas regiones y algunos cultivos. En las zonas noroeste y centro (Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Baja California, Guanajuato y Jalisco) se consumen cantidades importantes de plaguicidas de todo tipo para producir granos y una gran variedad de hortalizas de exportación. Se puede afirmar que hasta el 2004 prácticamente no había un agricultor en México que no usara uno o

más tipos de plaguicidas, sin la asesoría técnica y medidas de protección adecuadas (Albert, 2004).

No hay datos claros sobre la cantidad de plaguicidas que se usa actualmente en el país, pero hace unos 10 años se decía que se consumían alrededor de 50,000 toneladas anuales de ingrediente activo, con un valor en el mercado de entre 400 y 600 millones de dólares US. Un problema relacionado con el uso de plaguicidas, y que también plantea un riesgo ambiental y de salud importante, es el de los envases vacíos; donde el total de estos pudiera ser de unas 7 mil toneladas anuales, la gran mayoría de las cuales quedan dispersa en los campos y es fuente de riesgo ambiental y de salud (Albert, 2004).

García y Meza (1991), analizaron la presencia de plaguicidas en muestras de leche materna y sangre de infantes menores a tres meses de vida, residentes de Pueblo Yaqui, Sonora. Los resultados indicaron que el 100% de las muestras presentaban trazas de plaguicidas y en algunos casos, rebasaban las concentraciones límites establecidos por la FAO. En la misma zona, González (1991) detectó plaguicidas en seis pozos de ocho comunidades rurales que las abastecen de agua potable. La concentración de los plaguicidas rebasaron los límites máximos establecidos en la normatividad ambiental vigente en ese año. En otro estudio, Canales (1991) señala que la actividad agrícola de la región está ocasionando la elevación en la concentración de plaguicidas en los acuíferos, alcanzando ya las fuentes de agua potable y riego (Ortiz y col., 1997). Sin embargo, los plaguicidas seguirán siendo una herramienta necesaria para el control de plagas en los próximos años, a menos que se propongan alternativas para reemplazarlos totalmente (Kanekar y col., 2004).

2.5 Alternativas de descontaminación

Se han llevado a cabo estudios con el objetivo de minimizar o eliminar las propiedades tóxicas de estos plaguicidas en el ambiente. Se han aislado diversos géneros de bacterias

que son capaces de degradarlos, bajo un proceso de biorremediación, en un tiempo más corto que bajo condiciones naturales (Ortiz y col., 1997).

2.5.1 Métodos Fisicoquímicos

Las principales rutas de degradación de organofosforados en el suelo incluyen hidrólisis homogénea y heterogénea, misma que puede ser incrementada por la presencia de metales, sustancias húmicas y otros compuestos presentes en el suelo (Bavcon y col., 2007). Una de las principales rutas de degradación es la irradiación solar, donde la fotodegradación puede ocurrir por fotólisis directa ya que estos compuestos absorben en la región UV entre 240-310 nm. El proceso puede incrementarse por la presencia de otras especies como oxígeno o sustancias húmicas (fotólisis indirecta), que actúan como sensibilizadores naturales (Pehkonen y Zhang, 2002).

La mayoría de los procesos de degradación han surgido de los sistemas de tratamiento químico del agua, en los cuales, a través de procedimientos de degradación oxidativa se generan intermediarios muy reactivos que inician una serie de reacciones que llevan a la destrucción y remoción de estos contaminantes orgánicos. Estos procesos de oxidación avanzada (AOPs, por sus siglas en inglés) incluyen fotólisis de peróxido de hidrógeno y ozono, reactivo de Fenton y radiólisis del agua (Burrows y col., 2002).

Aun cuando algunos de estos procesos son efectivos, pueden presentar algunos inconvenientes como son la fotodegradación solar inducida de la mayoría de los plaguicidas que dan origen a productos muy persistentes en el ambiente. Por el contrario, los procesos que utilizan luz UV resultan ser más efectivos pero muy costosos. Los procesos fotocatalíticos que utilizan fotosensibilizadores son efectivos en el tratamiento de plaguicidas, aunque tienen la desventaja de que los fotosensibilizadores son altamente biotóxicos. Por otro lado, procesos químicos de degradación que utilizan radicales hidroxilos, son efectivos y de bajo costo, pero algunos productos de las reacciones pueden ser problemáticos (Burrows y col., 2002).

La presencia de microorganismos en el suelo puede dar origen a procesos bióticos importantes en la disipación de estos y otros compuestos xenobióticos, por lo que resultan ser una alternativa de degradación de plaguicidas atractiva.

2.5.2 Biodegradación de compuestos xenobióticos

Existen innumerables reportes sobre degradación biótica de compuestos orgánicos en el ambiente, mostrando la capacidad degradativa de una gran variedad de organismos, dentro de los cuales destacan hongos y bacterias.

Los microorganismos tienen la capacidad de degradar sustratos diferentes a las fuentes de carbono naturales debido a su capacidad evolutiva y de adaptación o aclimatación al medio (Alexander, 1994; Ortiz y col., 1997). Las transformaciones microbiológicas que ocurren durante el tratamiento de desechos son las mismas reacciones mediante las cuales los microorganismos heterotróficos se nutren y captan la energía necesaria para satisfacer sus requerimientos nutricionales, algunas de las cuales también destoxifican su ambiente inmediato (Yeomans y col., 2004).

Los compuestos orgánicos xenobióticos pueden ser degradados completamente (mineralización) a CO_2 y H_2O por poblaciones aeróbicas o a dióxido de carbono y metano por organismos anaerobios, procesos que están asociados al crecimiento; por otro lado, pueden ser transformados parcialmente a compuestos inocuos o de menor toxicidad que el compuesto original. Sin embargo, muchas veces la degradación no es muy eficiente, los compuestos son metabolizados lentamente o resultan resistentes al ataque microbiano bajo las condiciones ambientales prevalecientes. En este último caso, los microorganismos pueden carecer de las enzimas necesarias para llevar a cabo la transformación del compuesto a intermediarios metabólicos que puedan ser degradados completamente por las rutas del metabolismo central. En otras ocasiones, no están dadas en el sitio las condiciones necesarias para su desarrollo, o bien, los microorganismos degradadores necesarios no están presentes en el sitio (Yeomans y col., 2004).

En algunos casos el compuesto xenobiótico es transformado por algunas de las reacciones metabólicas sin servir de sustrato o fuente de energía para el microorganismo en un proceso no asociado al crecimiento (cometabolismo), teniendo por lo tanto que suministrar al medio una fuente de nutrientes y energía adicional para el desarrollo. En este caso el compuesto es transformado pero nunca degradado totalmente por el microorganismo, con el riesgo de acumulación de productos de degradación que pudieran resultar de mayor toxicidad (Alexander, 1999).

En los procesos de degradación bióticos se deben considerar algunos factores que afectan la actividad de los organismos heterotróficos y que finalmente determinan el tipo de proceso degradativo que se puede dar (aerobio o anaerobio; asociado al crecimiento o cometabólico).

Entre los factores podemos mencionar algunos fisicoquímicos que determinan la biodisponibilidad del contaminante (sorción, disolución, etc.) o limitaciones en el transporte de masa (difusión y solubilidad de oxígeno y nutrientes). Factores biológicos, como la disponibilidad de aceptores de electrones, tipo de población presente, tipo y concentración del contaminante, fuente de carbono alternativa en el medio, tipo de interacción y diversidad de la comunidad microbiana. Factores ambientales como pH, temperatura y contenido de humedad (Yeomans y col., 2004).

La biodegradación de un compuesto orgánico puede ser llevada a cabo por un organismo puro o mediante la participación concertada de una comunidad microbiana en la cual puede encontrarse una mayor capacidad degradativa y resistencia a toxicidad (Alexander, 1999).

Los sistemas enzimáticos responsables de la biodegradación de los compuestos xenobióticos están sujetos a control del metabolismo celular y requieren de un proceso de inducción de su síntesis para que se hagan presentes en el medio; esto se hace evidente al principio de la fase de aclimatación característica de las poblaciones

degradadoras. Otros mecanismos de control enzimático como la represión catabólica que pueden ejercer otros sustratos en el medio, deben considerarse, sobre todo cuando la degradación es cometabólica, ya que implica la utilización de una fuente de carbono alternativa, frecuentemente asociada a este tipo de regulación (Yeomans y col., 2004).

La movilización de material genético a través de plásmidos durante eventos de conjugación entre los microorganismos juega un papel primordial en la adquisición de capacidad degradativa de xenobióticos, ya que esta se encuentra, en muchos casos, codificada en los plásmidos que poseen; tal es el caso de la degradación de aromáticos como tolueno, xileno y naftaleno; terpenos, alcaloides e hidrocarburos halogenados como 2,4-D, clorobenzoato, y p-clorobifenilo, entre otros. De esta forma, los plásmidos participan en el surgimiento de nuevos caminos metabólicos involucrando enzimas que degradan xenobióticos hasta intermediarios del metabolismo central, a partir del cual completan su mineralización (Grady, 1985).

Los organismos degradadores de compuestos xenobióticos han adquirido esta habilidad tomando ventaja de las condiciones ambientales a las que han estado sujetas a través del tiempo, aunque muchas veces esta actividad ocurre a una velocidad menor que la necesaria para limpiar sitios muy contaminados. Hoy en día se están generando variedades de microorganismos genéticamente mejoradas con respecto a la capacidad degradadora de compuestos tóxicos en el ambiente (Ensley, 1994).

Siendo los plaguicidas organofosforados muy utilizados en México, es importante contar con cepas bacterianas con la habilidad de degradar este tipo de compuestos y poder utilizarlas en tratamientos biológicos de desechos y suelos contaminados, o aislar a partir de ellos sus sistemas enzimáticos (Ortiz y col., 2001).

2.6 Organismos biodegradadores de OP

Con el objetivo de minimizar o eliminar las propiedades tóxicas de estos plaguicidas en el ambiente, se han aislado de suelo, colectores de aguas negras y cuerpos de agua, diversos géneros de bacterias que son capaces de degradarlos, los cuales hidrolizan, reducen u oxidan el compuesto bajo un proceso de biorremediación, en un tiempo más corto que bajo condiciones naturales (Ortiz y col., 1997).

Se ha reportado la degradación de paratión etílico por bacterias tales como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Flavobacterium* sp. ATCC (Siddaramappa y col., 1973; Munnecke y Hsieh, 1974; Daughton y Hsieh, 1977; Adhya y col., 1981). De igual forma, organismos degradadores de paratión metílico tales como *Flavobacterium* sp. ATCC y *Pseudomonas* sp. ATCC (Adhya y col., 1981); *Pseudomonas* sp. (Chaudry y col., 1988); *Pseudomonas putida* (Rani y Lalithakumari, 1994); *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter sakazakii* y *Citrobacter freundii* (Ortiz y col., 2001); *Plesiomonas* sp. (Zhongli y col., 2001); *Bacillus* sp. (Sreenivasulu y Apama, 2001). Otros organofosforados como fenetotrión, coumafós y malatión también han sido degradados por algunos microorganismos.

La degradación de paratión ha sido más investigada que la de paratión metílico. La ruta metabólica mediante la cual algunos microorganismos degradan paratión fue inicialmente determinada por Munnecke y Hsieh (1976), como se aprecia en la figura 1 donde algunos pasos han sido plenamente confirmados (flecha gruesa) mientras que otros fueron solo postulados (flecha delgada), quedando pendiente su confirmación.

En otras investigaciones, mediante estudios de incorporación de radioactividad en [^{14}C] PNF, Ramanathan y Lalithakumari (1999) determinaron la ruta metabólica mediante la cual *Pseudomonas* sp A3 degrada metil paratión (Figura 2), confirmándose la incorporación de carbono proveniente de la porción aromática del metil paratión a los

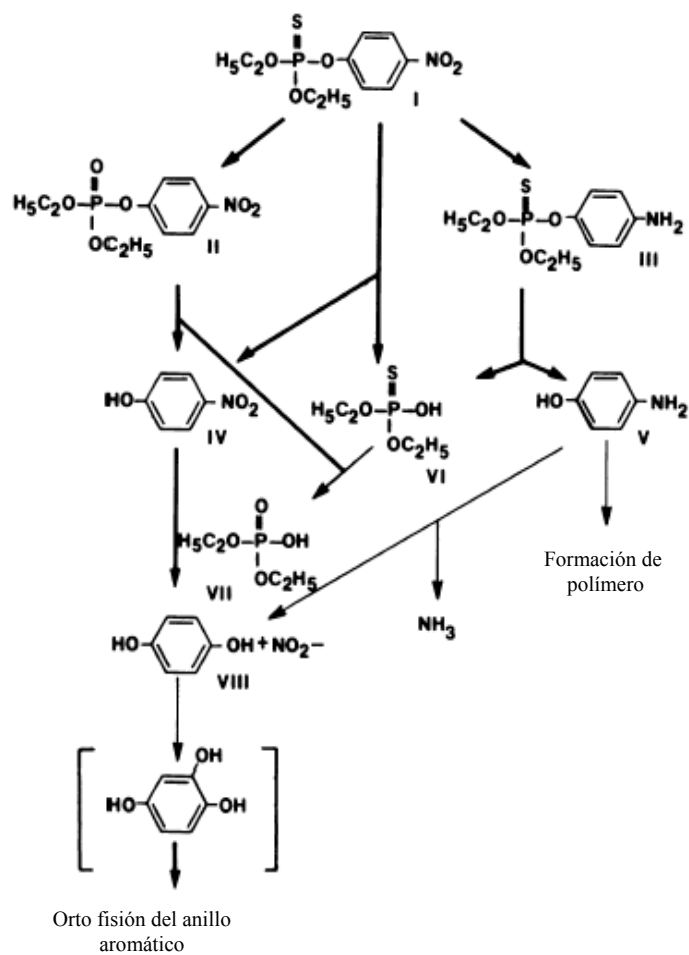


Figura 1. Ruta de degradación de paratión por un cultivo mixto bacteriano.

➡ Rutas definitivas; ➡ Rutas postuladas.

Fuente: Munnecke y Hsieh, 1976.

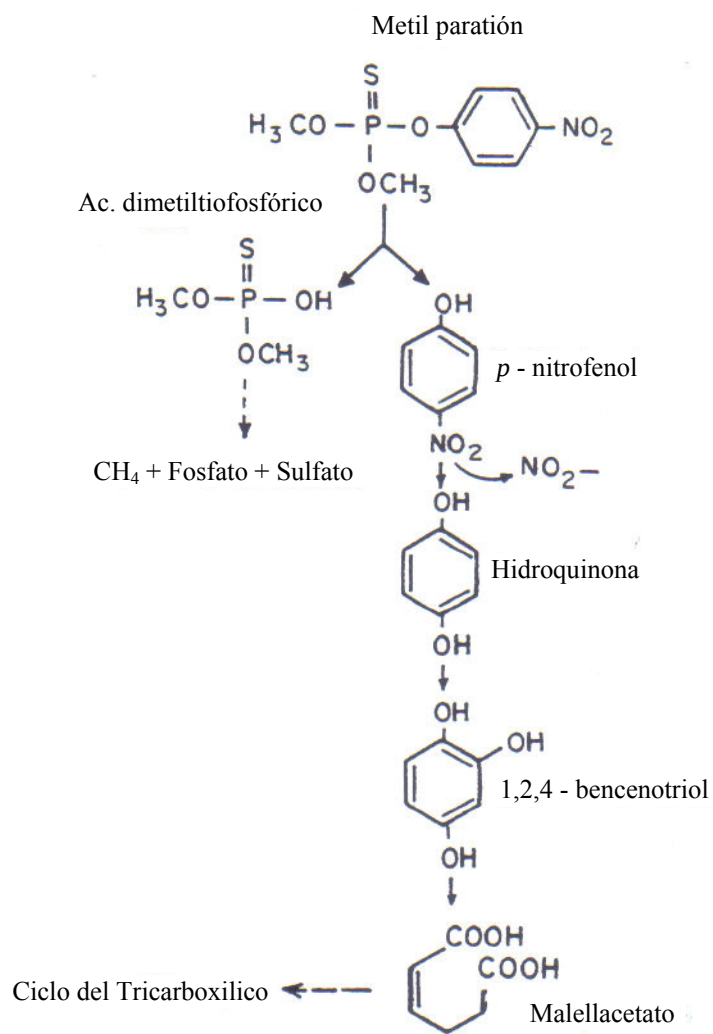


Figura 2. Ruta de degradación de metil paratión por la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp A3.

Adaptación de Ramanathan y Lalithakumari, 1999.

componentes celulares. De acuerdo a estas investigaciones, el PNF formado a partir del metil paratión fue utilizado como fuente de carbono y energía para llenar los requerimientos metabólicos de *Pseudomonas* sp A3 quien hidroliza metil paratión a dimetil fosforotioato y *p*-nitrofenol, donde este último al ser mineralizado hasta CO₂, sirvió como fuente de carbono. En una serie de reacciones, *p*-nitrofenol pierde el grupo NO₂⁻ hasta llegar a la *orto* fisión del anillo bencénico generando los intermediarios que entran al metabolismo central para ser completamente mineralizado a través del ciclo del ácido tricarboxílico.

La capacidad degradadora de estos organismos, se debe a la presencia de enzima hidrolítica, conocida genéricamente como una anhidrasa de organofosforados. Se han aislado numerosos organismos nativos y se ha evaluado su capacidad para degradar organofosforados. Sin embargo, recientemente se ha puesto énfasis en la generación de organismos genéticamente diseñados, con el fin de hacer más eficientes los procesos degradativos para su aplicación en biorremediación de sitios contaminados.

2.6.1 Organismos nativos

Sedar y col. (1982) aislaron un organismo con alta actividad de una enzima a la que llamaron paratión hidrolasa. Este organismo fue identificado como *Pseudomonas diminuta*. Encontraron que las colonias con actividad enzimática hidrolizaban rápidamente al paratión en *p*-nitrofenol (PNP), como lo indicaba la aparición del color amarillo en el cultivo. La enzima paratión hidrolasa estuvo presente en el cultivo aún sin la presencia del plaguicida, lo cual mostró que esta codifica constitutivamente en un plásmido.

Chaudhry y col. (1988) aislaron del suelo dos cultivos bacterianos mixtos capaces de utilizar paratión metílico y paratión etílico como única fuente de carbono. De esa mezcla solo *Pseudomonas* sp., hidrolizó el plaguicida a *p*-nitrofenol, aunque se necesitó glucosa u otra fuente de carbono para su crecimiento. Cuando se llevó a cabo la hibridación del

DNA de esta bacteria con el gen *opd* de *Flavobacterium* sp., se demostró una homología en su secuencia de bases (Ortiz y col., 1997).

En estudios realizados en México, Ortiz y col., (2001) aislaron un consorcio bacteriano con la capacidad de degradar paratión metílico en suelos agrícolas de Morelos, México. Utilizando al plaguicida como única fuente de carbono. Se determinó la actividad enzimática midiendo el cambio en absorbancia a 410nm, cuando una solución de 15mg/L de paratión metílico fue expuesta a un extracto enzimático el cual contenía la enzima paratión hidrolasa para producir *ácido dimetiltiofosforico* y *p-nitrofenol* (PNP). Para medir la actividad enzimática, consideraron la aparición de PNP. La enzima rompe paratión metílico y produce este metabolito y *ácido dimetiltiofosforico*, produciendo 1mol de PNP por cada mol de paratión metílico hidrolizado. En sus resultados observaron que el crecimiento fue aumentando al aumentar la concentración de paratión metílico. En su cinética se observó que al incrementar el crecimiento bacteriano, disminuía la concentración de paratión metílico.

Techelet y col., (1993) aislaron dos bacterias del género *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. las cuales degradaron paratión en dos etapas; primero se liberó el PNP con la acción de paratión hidrolasa y después el PNP se degradó por completo. También estudiaron el efecto de los cationes sobre la hidrólisis del paratión. Dicha hidrólisis fue inhibida en *Pseudomonas* sp. por la presencia de Cu^{+2} ; por el contrario, en *Xanthomonas* sp., el Cu^{+2} estimuló la hidrólisis del plaguicida (Ortiz y col., 1997).

Chen y col., (2002) optimizaron la composición de un medio para la producción de la enzima elastasa por la bacteria EL31410, en el que mantuvieron constante el pH a 7.4 y la temperatura a 37° C. Utilizaron un diseño factorial para estudiar los principales factores que afectan la producción de la enzima, una vez que encontraron los factores que más influían en la producción, utilizaron el método de superficie de respuesta para derivar el modelo estadístico de cada uno de los factores.

2.6.2 Organismos genéticamente diseñados

Recientemente algunas líneas de investigación se han enfocado a la generación de metodologías para manipulación de los genes que codifican OPA anhidrasas con el fin de incrementar la efectividad de estas enzimas hacia sustratos pobremente degradados. Se han implementado diferentes estrategias tales como mutagénesis dirigida para modificar varios aminoácidos involucrados en el sitio activo de la enzima y dar origen a mutantes con características catalíticas mejoradas contra paroxón y otros organofosforados (Ang y col., 2005).

Otra estrategia ensayada consistió en utilizar ingeniería genética para posicionar la enzima en la superficie de *Pseudomonas putida* JS444, con el fin de sobrellevar los problemas que tienen algunos organofosforados para ingresar fácilmente a la célula (Lei y col., 2005). Ya que la enzima es intracelular, Coppella y col., (1990) obtuvieron una versión de la enzima que pudiera ser excretada, para lo cual clonaron el gene que codifica paratión hidrolasa en *Streptomyces lividans* donde se expresó y excretó para su utilización en la restauración de aguas residuales.

En otros estudios Walker y Keasling (2002) introdujeron el gen *opd* que codifica la enzima degradadora de paratión así como los operones responsables de la degradación de p-nitrofenol en el genoma de *Pseudomonas putida* KT2442, con lo cual esta cepa pudo utilizar paratión como única fuente de carbono y energía.

2.7 Enzimas degradadoras de organofosforados

La capacidad degradadora de organofosforados de las bacterias se debe a la presencia en ellas de enzimas conocidas como triesterasas de organofosforados, pertenecientes al grupo de las anhidrasas de organofosforados tipo A. Estas enzimas responsables de iniciar la degradación, son altamente eficientes pudiendo hidrolizar un amplio rango de compuestos organofosforados, donde catalizan la ruptura de las uniones P=O, P-F o P=S

de la molécula. La mayoría de los microorganismos que son capaces de producir OPA anhidrasas son bacterias Gram-negativas, donde estas enzimas se localizan intracelularmente o pueden ser secretadas a través del espacio periplásmico. La membrana externa actúa como una barrera permeable y limita la interacción entre el plaguicida y la OPA anhidrasa que se encuentra dentro de la célula (Zhang y col., 2005). Entre las bacterias productoras de este tipo de enzimas podemos citar *Flavobacterium* sp. PAR⁺, *Pseudomonas diminuta* MG, *Escherichia coli* HB101, *Pseudomonas putida* PRS 2015, *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Las anhidrasas se pueden encontrar en mamíferos, insectos, bacterias y hongos (Attaway y col., 1987).

Recientemente estas enzimas han sido motivo de interés y extensa investigación por su potencial aplicación para remediar sitios contaminados con plaguicidas residuales y armas químicas como soman y sarin. Ellas pueden ser inhibidas por agentes quelatantes como el EDTA, ya que requieren la presencia de un ión divalente como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} para su actividad. El peso molecular de la A-esterasas están entre 30 y 90 kDa (Jokanović, 2001).

La estructura tridimensional de la triesterasa de *Pseudomonas diminuta* muestra 3 sitios de unión distintos (sub sitios) como bolsas hidrofóbicas responsables de la orientación del sustrato hacia el sitio activo de la enzima. Mediante mutagénesis dirigida de aminoácidos claves en cada uno de estos tres sub sitios se pudo mostrar que el aminoácido histidina 257 juega un papel importante en la estereo selectividad de la enzima. Los estudios han revelado también como la efectividad de la hidrólisis varía con el tipo de sustrato con el cual la enzima interacciona; por ejemplo, algunos insecticidas como metil paratión, clorpirifus y diazinón son hidrolizados de 30 a 1000 veces más lento que Paroxón, debido a interacciones desfavorables con el sitio activo (Dumas y col., 1989).

2.7.1 Mecanismo de reacción de paratión hidrolasa

Dumas y col., (1989) propusieron un mecanismo para la acción de la enzima paratión hidrolasa de *Pseudomonas diminuta* el cual se muestra en la figura 3. En este caso, el sitio activo de la enzima extrae un protón al agua y se activa para atacar directamente al fósforo de la molécula de paroxón el cual experimenta una inversión en su oxígeno de la molécula de paroxón favoreciéndose la hidrólisis de la unión éster del mismo para generar p-nitrofenol. Estudios adicionales han reportado la participación esencial en la catálisis de un residuo de histidina del sitio activo, ya que su ausencia inactiva a la enzima (Dumas y Rauchel, 1990).

2.8 Bases teóricas

Los microorganismos crecen en un amplio espectro de ambientes físicos y químicos; su crecimiento y otras actividades fisiológicas son una respuesta de su ambiente fisicoquímico.

2.8.1 Microorganismos

El crecimiento de microorganismos es caracterizado por el tiempo requerido para doblar su masa celular (biomasa) o número de células. La velocidad de crecimiento, es la velocidad en la que aumenta el número de células o biomasa por unidad de tiempo y el tiempo requerido para que la población se duplique se conoce como tiempo de duplicación (t_d) o tiempo de generación (t_{gen}). El tiempo de doblado de masa difiere del tiempo de duplicación celular porque la masa celular puede incrementar sin que incremente el número de células. Sin embargo, si en determinado medio el intervalo entre la masa celular o número de duplicación es constante con el tiempo, el organismo está creciendo a una velocidad exponencial. Bajo esas condiciones, el crecimiento se puede describir de la siguiente manera:

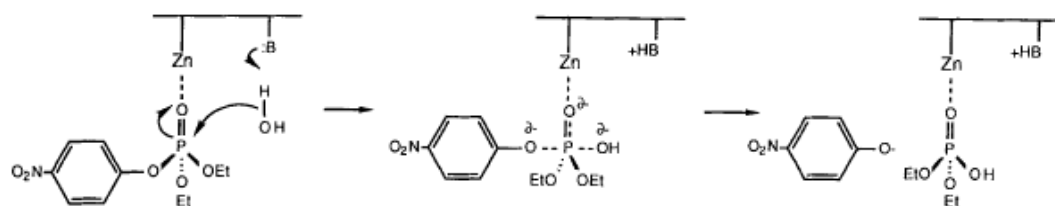


Figura 3. Mecanismo de degradación de Paroxón por fosforotriesterasa de *P. diminuta*.

(Dumas y col., 1989)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

ó

$$\frac{dN}{dt} = \mu_n N \quad (2)$$

donde X es la concentración celular en g/L, N es la concentración celular en células/L, t es el tiempo, μ es la velocidad específica de crecimiento en h^{-1} (masa) y μ_n es la velocidad específica de crecimiento (número).

La ecuación 1 describe el incremento de masa celular con respecto al tiempo y la ecuación 2 describe el incremento en número de células con respecto al tiempo. En la mayoría de las circunstancias el crecimiento es medido por el incremento de masa, de tal manera que se usara μ . El valor μX es la velocidad de crecimiento volumétrico (productividad volumétrica) en g/L-h (Wang y col., 1979).

Integrando la ecuación 1 y si la velocidad específica de crecimiento es constante la ecuación 3 queda de la siguiente manera:

$$\ln \frac{X_2}{X_1} = \mu \Delta t \quad (3)$$

La ecuación 3 puede ser resuelta para el caso en que $\Delta t = t_d$, que es, el tiempo requerido para que $X_2 = 2X_1$, entonces,

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (4)$$

De la ecuación 3, se ve que la velocidad específica de crecimiento es obtenida de la pendiente de la grafica de $\ln X$ contra el tiempo (Wang y col., 1979).

2.8.2 Cinética de crecimiento microbiano

El crecimiento, el cual es caracterizado por el incremento en la masa celular y/o número, ocurre solo cuando se satisfacen ciertas condiciones químicas y físicas, como son temperatura y pH, así como también la disponibilidad de los nutrientes requeridos.

Una curva de crecimiento intermitente típico de un microorganismo crecido en un medio químicamente definido se muestra en la figura 4. Esta curva de crecimiento consta de tres fases distintas: una fase lag que ocurre inmediatamente después de la inoculación del medio y es un periodo de adaptación de la población a las nuevas condiciones de crecimiento, en la cual se dan la síntesis o represión de enzimas o componentes estructurales de la célula. Como consecuencia, la fase lag puede ser muy corta o bastante larga; durante esta fase la masa celular irá cambiando sin cambiar el número de células (Wang y col., 1979).

Una vez que se completa esta fase, las células pasan a la fase de crecimiento; este crecimiento es usualmente exponencial o log, es decir, constante. La fase log es caracterizada por una línea recta en una grafica semilog del $\ln X$ contra el tiempo. Este es un periodo de crecimiento en equilibrio o de estado estacionario durante el cual, la velocidad específica de crecimiento μ es constante. En algún momento, la velocidad de crecimiento empieza a decrecer, ya sea por agotamiento de un nutriente esencial, o por acumulación de un producto de inhibición. No obstante, las células pasan por una transición hasta que la velocidad de crecimiento neta es cero.

La fase estacionaria ocurre cuando todas las células han dejado de dividirse o cuando las células viables están en equilibrio con las células muertas, es decir, cuando la velocidad de crecimiento es igual a la velocidad de muerte (Wang y col., 1979).

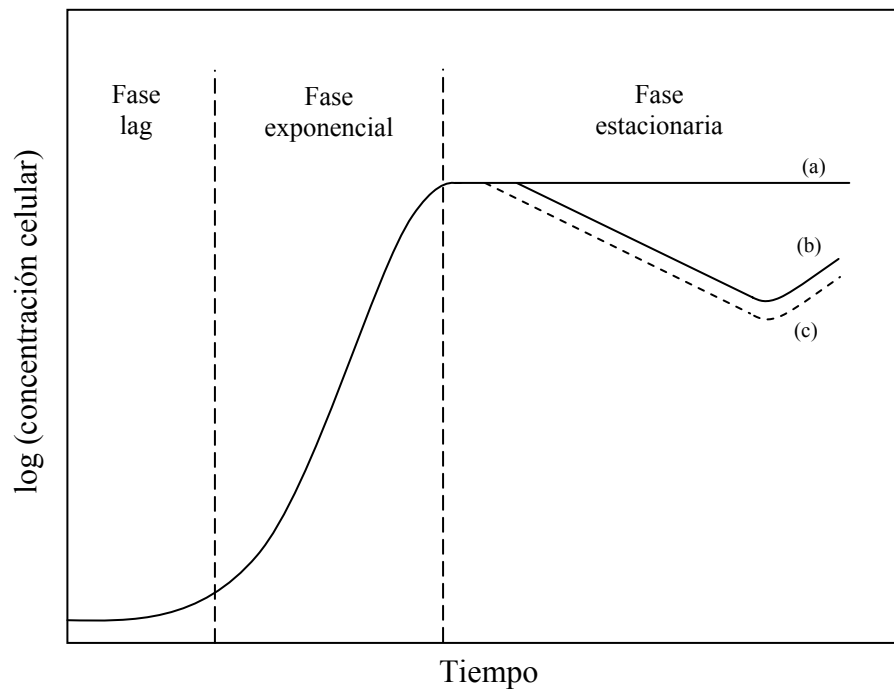


Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano.

- (a) Masa celular sin lisis.
- (b) Masa celular cuando hay lisis y crecimiento críptico.
- (c) Cuenta viable cuando hay lisis.

Adaptada de Wang y col., 1979.

2.8.3 Velocidad de crecimiento

Durante la mayoría de las fermentaciones intermitentes típicas la velocidad específica es constante e independiente de la concentración de nutrientes que va cambiando. Sin embargo, la velocidad de crecimiento es función de la concentración química que en este caso, son los nutrientes esenciales o sustratos para el crecimiento. La relación entre la velocidad de crecimiento y la concentración de sustrato fue observada por Monod (1949) la cual es similar a la cinética de saturación exhibida por adsorción molecular. Por lo tanto, un modelo similar a la isoterma de Langmuir de absorción molecular fue aplicado al crecimiento. El modelo de Monod tiene la siguiente forma:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento, $\mu_{\max}$ es la velocidad específica de crecimiento máxima, S es la concentración de sustrato y K_s es una constante igual a la concentración de sustrato cuando $\mu = 0.5\mu_{\max}$.

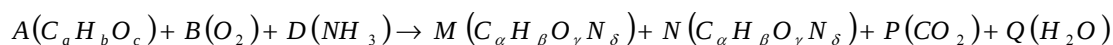
Los valores de K_s son bastante pequeños, lo que significa que $\mu \approx \mu_{\max}$ cuando $S > 10K_s$ y no es hasta que $S < 10K_s$ que la velocidad específica de crecimiento se vuelve una función fuerte de la concentración de sustrato. Ya que el valor de K_s es bajo, la velocidad específica de crecimiento durante la fase log es constante. La transformación de la fase log a estacionaria es usualmente muy rápida o abrupta, desde que el sustrato residual es muy poco, las altas concentraciones celulares rápidamente utilizan el sustrato restante. Por lo que es muy difícil estimar los valores de K_s en fermentaciones de cultivos intermitentes. Sin embargo es posible emplear velocidades cinéticas iniciales donde niveles iniciales bajos de sustrato son empleados y cuando la

velocidad de crecimiento inicial es medida antes de que la concentración de sustrato cambie significativamente (Wang y col., 1979).

El modelo de Monod está basado en observaciones empíricas pero es frecuentemente racionalizada por una analogía con la cinética enzimática de Michaelis-Menten con la hipótesis de que una sola velocidad limite el paso de la enzima-catalizada en control de la velocidad de crecimiento. Además, se les puede atribuir un significado físico y biológico a las dos constantes: $\mu_{\max}$ es la velocidad máxima de crecimiento en un medio químico dado, a temperatura específica y pH, y K_s es inversamente proporcional a la afinidad del microorganismo por el sustrato (Wang y col., 1979).

2.8.4 Rendimientos

El crecimiento y la formación de productos por microorganismos son procesos de bioconversión en los cuales los nutrientes químicos alimentados a la fermentación, son convertidos en masa celular y metabolitos. Cada una de estas conversiones puede ser cuantificada por el coeficiente de rendimiento expresado como la masa de células o producto formado por unidad de masa de nutrientes consumidos, $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ para células y productos, respectivamente. Por lo que el coeficiente de rendimiento representa la eficiencia de conversión. El significado de rendimiento de celular y de productos puede ser visto en una examinación de la estequiometria para el crecimiento y la formación de productos:



El coeficiente de rendimiento celular en el carbono:

$$Y_{x/s} = \frac{M}{A} \frac{(12\alpha + \beta + 16\gamma + 14\delta)/(1-r)}{(12a + b + 16c)}$$

donde r es la fracción de masa celular representada por cenizas.

De una manera similar el rendimiento del producto:

$$Y_{P/S} = \frac{N}{A} \frac{(12\alpha' + \beta' + 16\gamma' + 14\delta')}{(12a + b + 16c)}$$

En ambas ecuaciones, los términos en paréntesis son pesos moleculares.

La manera usual de calcular rendimientos es midiendo la masa celular o productos producidos y sustrato consumido durante un periodo de tiempo y se calcula de la siguiente manera:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Los valores anteriores representan los coeficientes de rendimiento observados (Wang y col., 1979).

2.9 Determinación del crecimiento

Biomasa es un término comúnmente utilizado para referirse a un organismo en un cultivo y los parámetros que se utilizan para medirla nos sirven para estimar el crecimiento así como otros parámetros que nos permiten analizarlo.

Se han diseñado diferentes métodos para medir la biomasa cuya selección depende de las propiedades de la misma, del medio de cultivo en el que se está desarrollando, de la exactitud, sensibilidad, así como velocidad requerida. Entre las propiedades del medio que determinan la selección del método a utilizar podemos mencionar la viscosidad, color, presencia de sólidos, presencia de productos de almacenamiento del organismo tales como glicógeno, entre otros. En la tabla 2 se pueden comparar algunos métodos en base a su sensibilidad.

Tabla 2. Comparación de la sensibilidad de algunos métodos para estimar la biomasa bacteriana.

Método	Peso seco mínimo de bacteria requerido para una estimación con un error < 2%
	(mg)
Peso seco	50
Proteína (Biuret)	1.0
DNA	1.0
Proteína (Lowry)	10^{-1}
Turbidez	10^{-1}
Cuenta celular	10^{-5}

2.9.1 Determinación de peso seco

La determinación del peso de biomasa seca es un método directo que involucra la separación del organismo del medio, el lavado del mismo utilizando de preferencia una solución isotónica que prevenga la lisis osmótica de microorganismos y finalmente el secado de la misma bajo condiciones no destructivas (temperaturas de $105 \pm 2^\circ \text{C}$ o menos).

Este método es probablemente el parámetro más inequívoco para determinar la biomasa, sin embargo tiene la desventaja de requerir un mínimo de 50 mg de biomasa, de ser tedioso y lento. Por otro lado es inaplicable principalmente en medios particulados (Pirt, 1975).

2.9.2 Método turbidimétrico

Este método ofrece una forma simple, rápida y barata de estimar la biomasa rutinariamente. Está basado en que la turbidez o densidad óptica de un cultivo es proporcional a la masa celular. Para determinar la densidad óptica se considera que el cambio de la intensidad de la luz atravesando una distancia L de un cultivo esta dado por la ecuación:

$$\frac{-dI_t}{dL} = \epsilon I_t C$$

donde ϵ es el coeficiente de absorción molar y C es la concentración. La integración de esta ecuación nos genera la ecuación:

$$\frac{I_t}{I_o} = e^{-\epsilon CL}$$

Un rearrreglo de la ecuación anterior nos da el valor de absorbancia (A):

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \epsilon' CL$$

Donde ϵ' es el coeficiente de extinción molar; T es el % de transmitancia e igual a $(I_t / I_o) \times 100$ y A es la absorbancia e igual a $\log_{10}(1/T)$. De esta manera una gráfica de absorbancia en coordenadas lineales vs. concentración deberá generar una línea recta (Wang y col., 1979).

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración y en suspensiones diluidas, la mayoría de las bacterias tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración (en base a peso seco) independientemente del tamaño celular. Esta relación es la base de la estimación del crecimiento en cultivos microbianos usando un método turbidimétrico el cual es rápido y no destructivo (Pirt, 1975). Cuando se estima la absorbancia de cultivos densos los valores se desvían de la linealidad predicha por la ley de Beer lo cual obliga a diluir las muestras para obtener un estimado de la absorbancia menor a 0.3. Igualmente, un método turbidimétrico no puede estimar concentraciones celulares menores a 10^7 unidades formadoras de células por ml.

La turbidez de una suspensión celular es medida mediante luz de longitud de onda entre 600 y 700 nm utilizando un espectrofotómetro o bien un colorímetro con filtro rojo (Wang y col., 1979).

2.10 Determinación de actividad enzimática

Durante la producción y purificación de una enzima es necesario contar con un método rápido y sensible que nos permita detectar y cuantificar la enzima en el sistema. Se han desarrollado métodos continuos que permiten el monitoreo continuo, mediante la determinación de alguna propiedad medible que permita la cuantificación de la

velocidad de desaparición del sustrato de la enzima o bien de la aparición de algún producto de la reacción, como sería medir un cambio de absorbancia generado por un compuesto que absorba en el rango UV-visible del espectro electromagnético. En el caso de métodos discontinuos se requiere que la muestra sea periódicamente extraída y analizada por algún método conveniente.

La cantidad de una enzima presente en solución no se expresa en unidades de masa o moles sino en unidades de actividad enzimática, basada en la velocidad de la reacción que la enzima cataliza.

La relación matemática entre la velocidad y la concentración de sustrato fue analizada por Michaelis y Menten, asumiendo que la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar reversiblemente un complejo transitorio enzima-sustrato (ES) el cual se degrada para formar el producto y liberar la enzima. Asumiendo que la concentración de la enzima es mucho menor que la concentración de sustrato, que inicialmente el producto está ausente y que la concentración del complejo ES es constante y está en equilibrio con [S] y [E], ellos derivaron la ecuación que lleva su nombre y que después fue modificada por Briggs-Haldane quienes asumieron un estado estacionario, la cual se describe como:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

donde, v_0 es la velocidad inicial de la reacción, $[S]$ es la concentración de sustrato en moles /l, $V_{\max}$ es la velocidad máxima e igual a: $V_{\max} = k_2 [E_0]$ y constante a muy alta concentración de sustrato, K_m es una constante (de Michaelis-Menten) y es el valor que tiene la $[S]$ cuando $v = \frac{1}{2} V_{\max}$.

La relación entre la velocidad inicial y la concentración de sustrato se puede apreciar en la figura 5.

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima que ocurre bajo condiciones de estado estacionario está dada por la ecuación:

$$v_0 = \frac{k_2 [E_0][S_0]}{[S_0] + K_m}$$

donde a $[S_0]$ constante

$$v_0 \propto [E_0]$$

es decir, la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima es directamente proporcional a la concentración de la enzima a una concentración de sustrato fija, estableciéndose entre ellas una relación lineal. Esta relación es válida cuando la concentración de sustrato es suficientemente grande y se aproxima a la región de saturación de la enzima. De acuerdo a la ecuación de Michaelis–Menten una enzima solo está saturada a concentraciones de sustrato infinita, por lo cual se utiliza convenientemente el término “cercano a la saturación” para definir el rango en el cual la velocidad inicial es igual a la velocidad máxima y es independiente de la concentración. Por esto, para hacer una determinación exacta de la cantidad de enzima presente, es una condición asegurar que el sustrato esté en exceso y saturando a la enzima y así evitar que la concentración de sustrato esté limitando la velocidad de la reacción (Palmer, 1991).

Otros prerequisites para llevar a cabo una determinación enzimática es el contar con un método específico para medir la velocidad de reacción y que el ensayo se lleve a cabo a condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica adecuadas para la enzima, así como contar con los cofactores requeridos y evitar la presencia de inhibidores de la enzima.

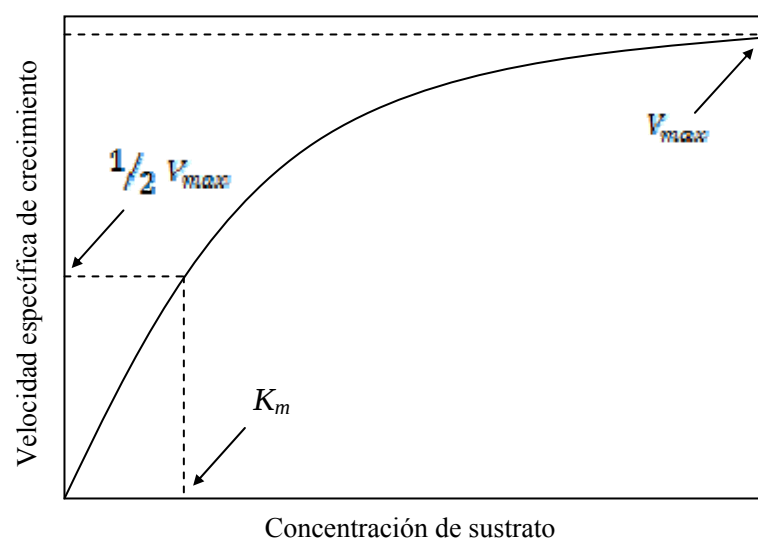


Figura 5. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten
Adaptada de Wang y col., 1979.

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB, por sus siglas en inglés) estableció una unidad estándar para medir la actividad de una enzima, la Unidad Internacional de enzima (U o IU) y la definió como la cantidad de enzima que convierte un micro mol de sustrato en producto en 1 minuto, bajo condiciones definidas de temperatura, pH y concentración de sustrato. Aunque esta es una unidad internacionalmente aceptada, muchos investigadores utilizan definiciones más convenientes para simplificar los cálculos (Segel, 1976).

Cuando se trabajan con protocolos de purificación de una enzima, la concentración de esta en extractos crudos se expresa como unidades/ml y siendo esta una proteína, durante las etapas de purificación, es común expresarla como actividad específica, donde las unidades de actividad de una enzima se dividen entre la cantidad total de proteína presente (unidades/mg de proteína). Este parámetro se incrementa a medida que se avanza en el proceso de purificación, permitiendo calcular el grado de purificación que va alcanzando la enzima (Palmer, 1991).