



Universidad de Oriente
Faculta de Ciencias Naturales
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial

**TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE MÁSTER EN
BIOTECNOLOGÍA
MENCIÓN AMBIENTAL**

TEMA: Degradación de compuestos organoclorados por el consorcio bacteriano RS-13 aislado de ambientes contaminados.

AUTOR: Lic. Ibrahim Justiz Mendoza

TUTORES: MSc. Irasema Pérez Portuondo

Dra. C. Rosa María Pérez Silva

Santiago de Cuba, 2014

AGRADECIMIENTOS

Durante este tiempo de trabajo he recibido muestras elocuentes de apoyo y ayuda incondicional, por lo que agradezco a muchas personas que me dedicaron su valioso tiempo, en especial:

- ❖ A Dra. C Rosa Catalina Bermúdez por su confianza, su perseverancia y apoyo.
- ❖ A mis tutoras Dr. C Rosa María Pérez Silva y MSc. Irasema Pérez Portuondo, por dedicar parte de sus valiosos conocimientos y tiempo a enriquecer este trabajo y superación profesional.
- ❖ Al Dr. C Manuel Serrat por su paciencia, hermandad, confianza y por todos los conocimientos transmitidos.
- ❖ A Lic. Isabel por sus consejos acerca de las técnicas de analíticas, críticas y ayuda cuando fue necesario.
- ❖ Al colectivo de profesores del la Maestría.
- ❖ En especial a mi Esposa Raquelita, por su ilimitada paciencia en este largo camino y su apoyo incondicional en todo momento.
- ❖ A mi papá por sus sabios consejos en todo momento de la maestría.
- ❖ A mis compañeros del laboratorio de la Cervecería Hatuey por su ayuda incondicional.

A todos Muchas Gracias.

RESUMEN

En este trabajo se validó el método colorímetro de la 4-aminoantipirina por adecuación para poder cuantificar las concentraciones de compuestos organoclorados en muestras ambientales. Para determinar el poder de degradación del consorcio bacteriano (RS-13), el mismo fue incubado en presencia de 2-clorofenol y 4-clorofenol a diferentes concentraciones. La degradación de 2-CF tuvo lugar bajo las concentraciones de 25 mg.L⁻¹ y 55 mg.L⁻¹ respectivamente y en el 4-CF a 40 mg.L⁻¹ y 65 mg.L⁻¹. La degradación de ambos compuestos por el consorcio bacteriano (RS-13) fue seguida por la cuantificación de fenoles totales, demostrándose que el consorcio bacteriano estudiado es capaz de degradar el 2-CF en 24 horas 45% de la concentración inicial y 47% en la segunda concentración a las 24 horas. En el 4-CF se degradó 26% en la primera concentración y 32% en la segunda concentración. Confirmándose la capacidad de degradar compuesto organoclorados por el consorcio estudiado. El mecanismo de degradación de los compuestos organoclorados estuvo marcado por la liberación de cloruro.

Palabras claves: compuestos organoclorados, 2-clorofenol, 4-clorofenol, consorcio bacteriano, degradación

SUMMARY

In this work the colorimeter method of 4-aminoantipirina was validated by adaptation to be able to quantify the concentrations of organochlorate compound in environmental samples. To determine the power of degradation of the bacterial consortium (RS-13), the same one was incubated in 2-chlorophenol presence and 4-chlorophenol to different concentrations. The degradation of 2-CF took low place respectively the concentrations of 25 mg.L⁻¹ and 55 mg.L⁻¹ and in the 4-CF to 40 mg.L⁻¹ and 65 mg.L⁻¹. The degradation of both compounds for the bacterial consortium (RS-13) it was continued by the determination of total phenol, being demonstrated that the studied bacterial consortium is able to degrade the 2-CF in 24 h 45% of the initial concentration and 47% in the second concentration at the 24 h. In the 4-CF it demeaned 26% in the first concentration and 32% in the second concentration. The capacity to degrade organochlorate compound for the bacterial consortium (RS-13) was confirmed. The mechanism of degradation of the organochlorate compound was marked by the liberation of chloride.

Passwords: organochlorate compound, 2-chlorophenol, 4-chlorophenol, bacterial consortium, degradation.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Características de compuestos organoclorados	4
1.1.1 Fuentes generadoras de compuestos organoclorados.	5
1.2 Generalidades de la contaminación ambiental por compuestos organoclorados.	5
1.2.1 Tratamiento de la contaminación ambiental por compuestos organoclorados.	6
1.3 Vías de biodegradación de compuestos organoclorados.....	7
1.3.1 Degradación microbiana de compuestos organoclorados.....	9
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	10
2.1 Materiales y Métodos	10
2.1.1 Materiales.....	10
2.1.2 Métodos analíticos.	11
2.2 Evaluación de la tolerancia de los aislados bacterianos ante el 2-clorofenol (2-CF).	12
2.3 Adaptación del aislado bacteriano.....	13
2.4 Degradación de compuestos organoclorados por el consorcio bacteriano RS-13.....	13
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
3.1 Validación por adecuación del método colorimétrico de la 4-aminoantipirina para la cuantificación de compuestos fenólicos.....	14
3.1.1 Linealidad	14
3.1.2 Precisión y exactitud	15
3.1.3 Límites de detección y cuantificación	16
3.1.4 Robustez	16
3.1.5 Determinación de compuestos fenólicos en muestras de medio de cultivo.	18
3.2 Crecimiento del consorcio bacteriano RS-13 en 2-clorofenol y 4-clorofenol.....	19
3.2.1 Evaluación de la tolerancia del consorcio bacteriano RS-13 en 2-clorofenol y 4- clorofenol.	19
3.2.2 Crecimiento de RS-13 sobre el 2-clorofenol y 4-clorofenol.....	20
3.3 Degradación de 2-clorofenol y 4-clorofenol por el consorcio bacteriano RS-13.....	22
CONCLUSIONES.....	26
RECOMENDACIONES.....	27
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	28
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El siglo XX se designó como el siglo de la química orgánica debido al desarrollo de diferentes compuestos utilizados para la elaboración de una infinidad de nuevos productos: fibras sintéticas, plásticos, compuestos farmacéuticos, etc. Paralelamente, esto ha supuesto el vertido al medio ambiente de efluentes líquidos, sólidos o gaseosos, incorporando número de estas sustancias, con un fuerte impacto asociado sobre el medio receptor. Este impacto está en numerosas ocasiones originado por el papel limitado que pueden jugar estas sustancias en los ciclos naturales de descomposición de la materia debido a su carácter antropogénico y xenobiótico (Paz, 2002). Un ejemplo claro lo constituye la industria química y petroquímica, al igual que los residuos generados por el sector agroindustrial.

El fenol junto con sus derivados son los representantes más comunes de contaminantes orgánicos tóxicos, lo cual ha dado como resultado efectos acumulativos en el medio ambiente. Estos contaminantes se han encontrado en las corrientes de desagüe desperdiciadas de varios procesos y operaciones de industrias, como la gasificación de carbón, producción de resina, industrias petroleras, agricultura, producción de fármacos, la manufactura explosiva, el plástico, las industrias de barniz y las industrias textiles (Juangy col 2006). Por tanto el fenol constituye un compuesto mirado como un contaminante de prioridad por todos los países del mundo.

El uso extensivo del fenol ha traído consigo una contaminación extendida de la tierra y el agua subterránea, afectando a organismos vivientes debido a la toxicidad del compuesto. La buena solubilidad de fenol dentro del agua y su elevado contenido, muestra la alta probabilidad del fenol de actuar como un agente contaminante, deteriorándose las características organolépticas del agua. La concentración de esta sustancia puede impedir la fotosíntesis en las diatomeas y algas verdes-azules; concentraciones de fenol con valores entre 100 y 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, causa la inhibición completa de la fotosíntesis (Kostyeav, 1973).

La biorremediación es un proceso mediante el cual los microorganismos degradan o transforman contaminantes orgánicos tóxicos. Se han aislados microorganismos que pueden degradar varios contaminantes (nitroaromáticos, cloroaromáticos, aromáticos policíclicos, bifenilos, bifenilospoliclorados y componentes de aceites) para utilizarlos en la biorremediación de sitios contaminados. Sin embargo, algunos de los compuestos xenobióticos, como los compuestos nitrados y aromáticos halogenados, pesticidas y explosivos son muy estables y químicamente inertes bajo condiciones ambientales. Algunos de estos compuestos son metabolizados únicamente en presencia de una fuente de

carbono alterna, ya que de lo contrario son solamente transformados, sin llegar a mineralizarse.

Muchos microorganismos son capaces de metabolizar completamente o mineralizar diferentes contaminantes orgánicos medioambientales, dentro de estos encontramos el fenol y sus derivados, que pueden ser degradados bajo condiciones aerobias y/o anaerobias (Agarry y col, 2008). En este sentido el género *Pseudomonas* ha demostrado la habilidad para degradar el fenol de manera eficaz.

La selección de tecnologías biotecnológicas adecuadas, depende de las características del contaminante a tratar, además del aprovechamiento del amplio espectro de reacciones metabólicas que exhiben los organismos vivos, lo que constituye un aspecto a tener en cuenta en la concepción de sistemas de tratamiento que minimicen los impactos que ocasionan el vertido de residuales al ambiente (Silva, 2006).

En Cuba, a pesar del trabajo que se realiza en el cuidado y conservación del medio ambiente, la contaminación de los embalses, ríos, presas, mares y bahías por el vertido continuo de aguas residuales sin tratar o insuficientemente depurados, genera serias alteraciones en estos cuerpos o corrientes receptoras, provocando un deterioro, en muchos casos notable, de las condiciones de vida e higiénico-sanitarias de los asentamientos sociales aledaños, desde el punto de vista ambiental, económico, estético y cultural (Cardero, 2008).

El estudio presente es diseñado para examinar la efectividad de un conjunto de cepas en la remoción de compuestos organoclorados en aguas residuales. Los organismos seleccionados ofrecen ventajas sobre otros relacionados en la literatura relacionada con el tema. El presente trabajo consta de 2 partes evaluar la tolerancia de los microorganismos seleccionados y una segunda parte relacionada con la capacidad de degradar compuestos organoclorados por microorganismos, evaluando el mecanismo y la cinética, los efectos de los parámetros de remoción: pH, temperatura, tiempo de remoción.

DISEÑO TEÓRICO

Tomando en consideración todos los elementos anteriormente expuestos, se planteó para el desarrollo de esta tesis de maestría el siguiente diseño teórico:

Necesidad social.

Demostrar que el consorcio RS-13 aislado de ambientes contaminados (Hidrocarburos) tiene la capacidad de adaptarse en medio con compuestos organoclorados y a su vez

degradar ciertas cantidades en función de su supervivencia. Lo anterior posibilitará su uso futuro en ensayos de biodegradación.

Problema

Carencia de microorganismos con capacidad de degradar compuestos orgánicos recalcitrantes presentes en aguas y suelos.

Hipótesis de trabajo

Contar con cepas bacterianas con potencialidades de degradar compuestos orgánicos contaminantes, permitirá disminuir el impacto que ocasionan los compuestos clorofenólicos en el medioambiente.

Objetivo general

Estudiar la degradación de compuestos organoclorados por el consorcio bacteriano RS-13 aislado de ambientes contaminados con hidrocarburos.

Objetivos específicos

1. Realizar la validación por adecuación del método colorimétrico 4-aminoantipirina para la cuantificación de compuestos fenólicos en muestras ambientales.
2. Ensayar el crecimiento del consorcio bacteriano RS-13 en presencia de 2-clorofenol y 4-clorofenol a dos niveles de concentración.
3. Determinar la capacidad de degradación de 2-clorofenol y 4-clorofenol del consorcio bacteriano RS-13.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN

BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1 Características de compuestos organoclorados

Los clorofenoles están situados en los sitios de los ácidos débiles, acidez que está dada por el número y posición de los átomos de cloro relativos a los grupos hidroxilo. Son sólidos a temperatura ambiente. En estos, el anillo aromático del fenol está sustituido con 1 a 5 átomos de cloro (Figura 1.1). Son intermediarios versátiles en síntesis química, debido a que, tanto en los grupos hidroxilo como el anillo aromático puede reaccionar por una sustitución tanto nucleofílica como una sustitución hidrofílica y son fácilmente oxidados (Zafra, 2010).

El 2-clorofenol (Figura 1.2) está formado por un 1 átomo de cloro en la posición orto unido a un átomo de hidrógeno y presenta características físicas y químicas como: fórmula molecular C_6H_5Cl , peso molecular de 128.56 g/Mol y una densidad de 1.2573 g/cm³ a 25 °C. Tiene una apariencia de líquido ámbar ante la luz, presenta una solubilidad en agua de 20 g.L⁻¹ a 20 °C, el punto de fusión es de 9.4 °C y el punto de ebullición es de 174 °C. Es soluble en benceno y etanol, presenta una presión de vapor de 0.308 kPa, es corrosivo y causa mareos si es aspirado por las fosas nasales sin protección.

El 4-clorofenol (Figura 1.3) está formado por un 1 átomo de cloro en la posición para unido a un átomo de hidrogeno y presenta las siguientes características físicas y químicas: fórmula molecular C_6H_5Cl , peso molecular de 128.56 g/Mol y una densidad de 1.2238 g/cm³ a 25 °C. Es un sólido húmedo de color blanco a amarillo cristalino, presenta una solubilidad en agua de 20 g.L⁻¹ a 20 °C, el punto de fusión es de 4.3 °C y el punto de ebullición es de 220 °C, el índice de refracción es de 1.5479 g a 40 °C; es soluble en benceno, etanol, es corrosivo; al igual que el 2-clorofenol causa mareos si es aspirado por las fosas nasales sin protección. Este compuesto es un problema de contaminación para ambientes acuáticos y terrestres, además que es utilizado para fabricar otras sustancias químicas, para la obtención de antiséptico local, como esterilizantes y como disolventes; también se ha utilizado en diversas actividades industriales y en la industria farmacéutica (Kristiansen y col, 1994; Rogers y Gerlanch, 1996).

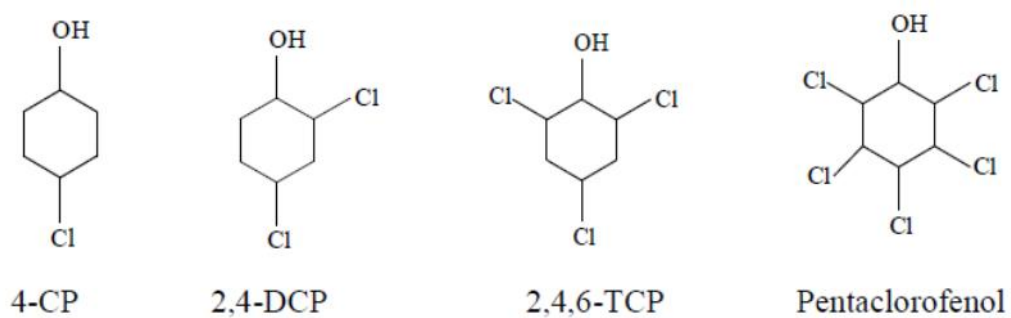


Figura 1.1. Estructura química de los compuestos fenólicos clorados.

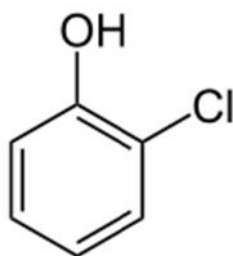


Figura 1.2. Estructura química del 2-clorofenol.



Figura 1.3. Estructura química del 4-clorofenol

1.1.1 Fuentes generadoras de compuestos organoclorados.

Dentro de los clorofenoles, el 2-clorofenol es uno de los que se produce con mayor frecuencia como un intermediario en la producción del fenol y de los colorantes y resinas con base fenólica. Es muy frecuente su presencia en los residuales de las plantas petroquímicas y refinerías y en conjunto con el fenol, el cual puede alcanzar hasta los 3000 mg.L⁻¹, puede llegar a interferir con los procesos desarrollados en las plantas de tratamiento de estos residuales (Farrell y Quilty, 2002). También puede ser encontrado en los suelos y aguas aledañas a pozos petrolíferos (Banerjee y Ghoshal, 2010). También puede formarse durante la cloración del agua de beber que tenga un contenido fenólico, ejemplo contaminación con compuestos húmicos (Gallego, 2001). Una de las más importantes aplicaciones del 4-clorofenol está en la síntesis de derivados de quinizarina y de antraquinonas, así como también en la síntesis de un biocida como el 2-benzil-4-clorofenol. El 4-clorofenol es uno de los materiales crudos para la síntesis de dos fungicidas, el diclorofeno y el triadimefeno. También está involucrado en la síntesis de una droga como el etil- α , α -dimetil-4-clorofenoxi acetato, utilizado como un agente reductor del colesterol, esta síntesis involucra reacciones con acetona y cloroformo seguidas por una esterificación del etanol (Zafra G, 2010).

1.2 Generalidades de la contaminación ambiental por compuestos organoclorados.

La concentración, estructura, pH de la sustancia y del medio, así como la velocidad de incorporación y el metabolismo del compuesto fenólico, determinan el grado en que éste afecta a los organismos, ya sea de manera crónica o por una toxicidad aguda (Zafra, 2010). La toxicidad de los clorofenoles es variable y depende de la cantidad de átomos de cloro asociados al anillo aromático. Dentro de los monoclorofenoles, el 2- y 3- (orto y meta) clorofenol son considerablemente más tóxicos que los fenoles diclorados, aunque menos tóxicos que el pentaclorofenol y esto puede estar relacionado también con la posición que ocupa el cloro en la molécula haciendo más difícil su degradación (Annachhatre y col, 1996). El 2-clorofenol debido a su mayor solubilidad en agua, comparada con todos los clorofenoles, tiene más probabilidades de contaminar los ecosistemas llegando hasta las aguas subterráneas, además de absorberse fuertemente a los sedimentos de los sistemas acuáticos (Hazardous Substances Data Bank, 2012). Este en conjunto con el fenol está entre los compuestos declarados como peligrosos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos debido a su persistencia (ATSDR, 2003).

Existen diferentes factores, tanto ambientales como biológicos, que pueden aumentar o disminuir el efecto crónico de los compuestos fenólicos sobre los organismos (Zafra, 2010).

1. Entre los factores ambientales destacan:

- a) La fotólisis, que aumenta o disminuye los efectos de los compuestos fenólicos en función del tipo de los productos finales formados.
- b) Sinergismo, donde la toxicidad de los fenoles en ocasiones no sólo se debe en sí al compuesto puro, sino a su asociación con otros compuestos u otros contaminantes que existen en el ambiente.
- c) El pH y la toxicidad puede variar dependiendo de las condiciones de acidez o alcalinidad existente en el medio, generalmente la toxicidad de los compuestos fenólicos aumenta con pH ácidos.
- d) La temperatura, al aumentar es mayor la sensibilidad de los organismos acuáticos hacia los compuestos fenólicos debido a que se incrementa su metabolismo.
- e) La concentración de oxígeno disuelto, al disminuir en el agua, los organismos aumentan su respiración y con ellos son más sensibles a los compuestos fenólicos debido a que los absorben más rápido.

2.- Entre los factores biológicos se encuentran (Zafra G, 2010).

- a) Degradación microbiana, la descomposición por parte de los microorganismos disminuye la toxicidad de muchos compuestos fenólicos.
- b) Edad y talla de los organismos, en general los organismos pequeños son más sensibles que los organismos grandes.
- c) Estacionalidad, en organismos acuáticos por ejemplo, en el verano la actividad metabólica es superior debido al aumento de la temperatura, por lo que son más sensibles que en el invierno.
- d) Madurez sexual, se ha observado que los organismos sexualmente maduros son menos tolerantes a los compuestos fenólicos que los organismos juveniles.

1.2.1 Tratamiento de la contaminación ambiental por compuestos organoclorados.

Para el tratamiento de estos compuestos se emplean métodos químicos y físicos como son la ozonización, filtración con carbono activado, procesos que utilizan el H_2O_2/UV , o

la filtración por membranas, que son costosos, además de que pueden dar origen a subproductos más tóxicos.

La biodegradación que explota la capacidad de los microorganismos (especialmente las bacterias) para convertir los contaminantes orgánicos en agua, dióxido de carbono y biomasa bajo condiciones aerobias o anaerobias, permiten un proceso más barato, con un mínimo de impacto ambiental que logra remover los estos contaminantes y restaurar los lugares afectados, evitando con la mineralización completa, la aparición de subproductos peligrosos (*Banerjee y col, 2010*).

1.3 Vías de biodegradación de compuestos organoclorados.

La degradación microbiana aerobia de los compuestos aromáticos ocurre por vía del catecol como metabolito principal. La degradación del catecol puede cursar por la vía orto o meta.

En la degradación del 2-Clorofenol se comienza con la formación del 3-clorocatecol. La degradación por vía meta del 3-clorocatecol (en la posición extradiol), forma un compuesto que se une de manera irreversible a la enzima que debería degradarlo, impidiendo su acción o dando lugar a un intermediario altamente reactivo que hace el mismo efecto pero antes libera el cloro, aunque no la cantidad esperada, indicando degradación incompleta (Figura 1.4). El intermediario formado se acumula en el medio de cultivo dando una coloración pardasegún Farrel and Quilty (1999). Por medio de la vía orto el 3-clorocatecol se rompe en la posición intradiol logrando una degradación completa pues se forman intermediarios que entran al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Fetzner y Lingens, 1994; Pieper 2005). En estas vías participan las enzimas fenol hidrolasa, clorocatechol 2,3-dioxigenasa o clorocatechol 1,2-dioxigenasa como las principales.

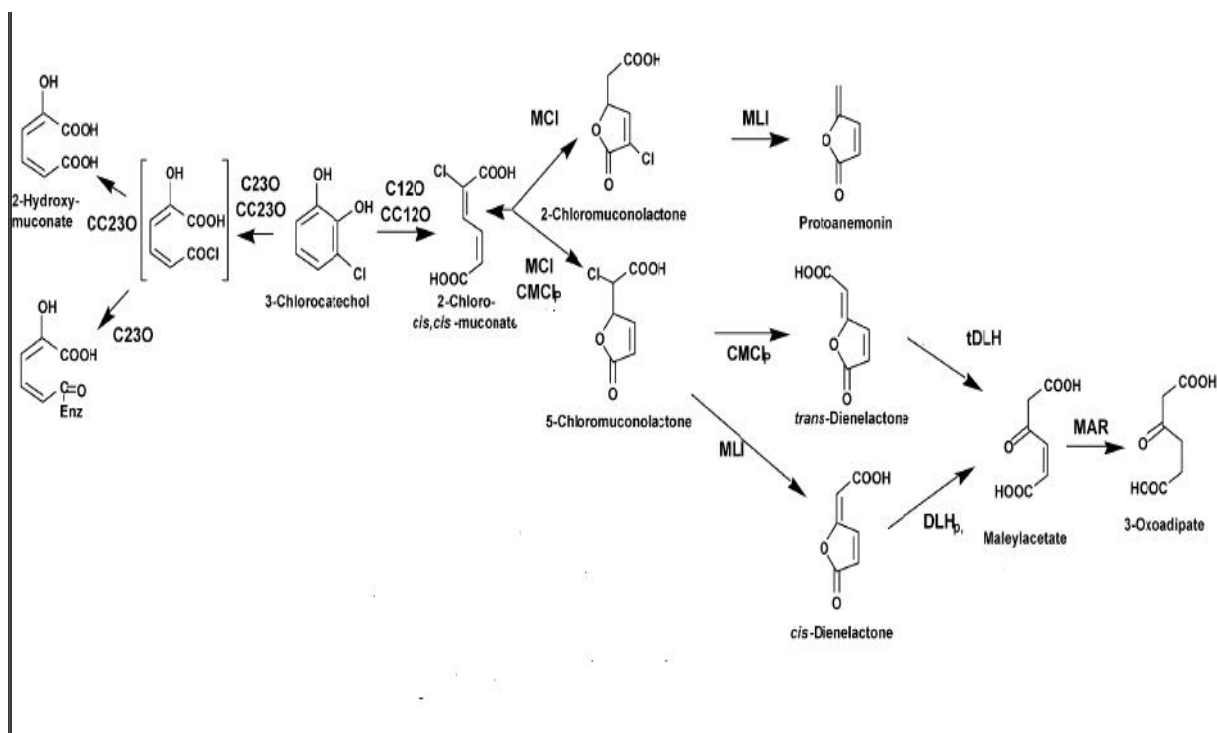


Figura1.4. Vías de degradación del 2-clorofenol. I: fenol hidroxilasa; C23O: catecol-2,3-dioxigenasa; CC23O: clorocatecol-2,3-dioxigenasa; C12O: catecol-1,2-dioxigenasa; CC12O: clorocatecol-1,2-dioxigenasa; MCI: muconatocicloisomerasa; CMCIp: cloromuconatocicloisomerasa de protobacteria; MLI: muconolactonaisomerasa; DLHp: dienolactona hidrolasa de protobacteria; tDLH: transdienolactona hidrolasa; MAR: maleilacetatoreductasa (Farrell and Quilty, 1999; Pieper, 2005).

Mientras que los xenobióticos, tales como compuestos aromáticos (organoclorados, entre otros) son mineralizados vía el desdoblamiento en *orto* (Figura 1.5). La degradación de substratos cloro y metilaromáticos en mezclas es a menudo incompleta, provocando una acumulación de metabolitos finales como clorocatecoles, semialdehídos hidroximucónicos clorados (HMS's), entre otros (Zafra, 2010). Se ha descrito que *Comamonas testosteroni* JH5, realiza una mineralización completa y rápida de una mezcla de 4-clorofenol (4-CP) monometilfenoles (Hollender *et al*, 1994), y esto lo lleva a cabo por una fisión en el anillo en *meta*. Por lo cual, no hay acumulación de HSM y si una liberación de cloro en cantidades estequiométricas. El crecimiento de *C. testosteroni* promueve al incrementar la concentración de 4-CP hasta 1.8 mM (Hollender *et al*, 1997).

Vía Hidroquinol: Por esta vía se degrada mayoritariamente el 4-clorofenol (Nordin, *et al*, 2005). Estos autores proponen dos vías para su degradación, por la acción de *A. chlorophenolicus* A6, la primera vía ocurre la generación de un compuesto llamado benzoquinona que se transforma posteriormente a hidroquinona. En la segunda propuesta el 4-clorofenol entra en contacto con la fenol hidrolasa dando lugar al 4-clorocatecol, posteriormente por acción enzimática se forma el 5-clorohidroxiquinol, luego aparece la formación de la 2-hidroxi-1,4-benzoquinona y seguido la formación del hidroxiquinol y como producto final el maleilacetato, en este caso los autores sugieren que la formación de 2-hydroxy-1,4-benzoquinone es por la liberación del cloro del anillo aromático dando lugar al 5-clorohidroxiquinol (Figura 1.6).

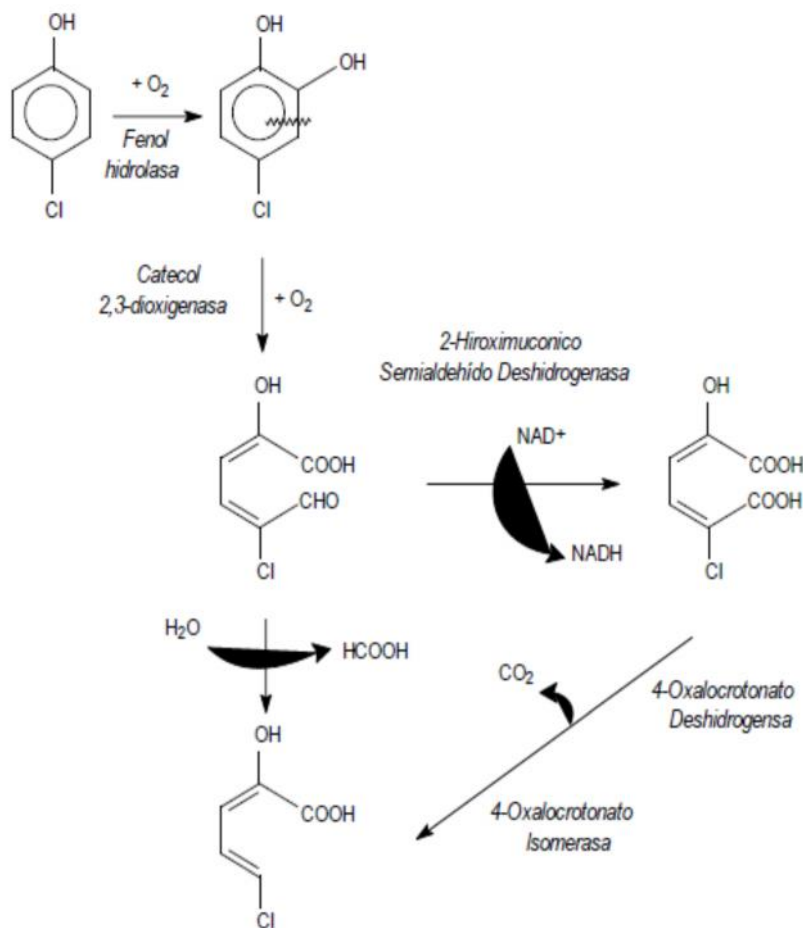


Figura1.5. Vías de degradación del 4-clorofenol.

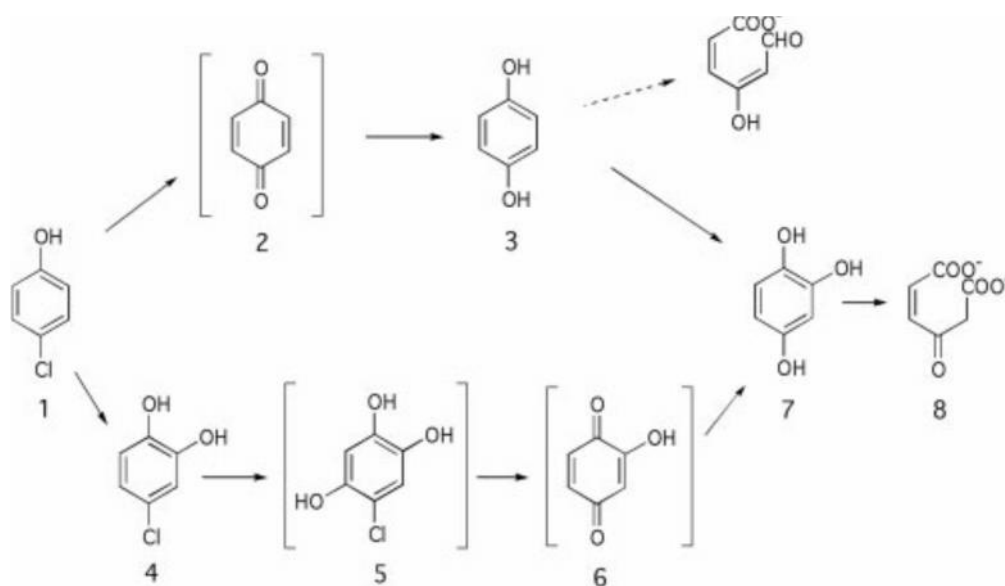


Figura 1.6. Degradación del 4-clorofenol por la vía del Hidroxiquinol.

1.3.1 Degradación microbiana de compuestos organoclorados.

Existe una gran variedad de microorganismos que han sido aislados y caracterizados, a partir de efluentes de transformación química e industriales, las cuales han revelado la capacidad que poseen para degradar compuestos organoclorados, es decir sustancias aromáticas como el fenol, catecol, y compuestos clorados a bajas concentraciones. Entre estos se encuentran como degradadores de fenol a *Pseudomonasputida*(Hill y Robinson, 1995; Monteiro *et al.*, 2000; Gonzales *et al.*, 2001); *Pseudomonas*spp. (Bayly y Wigmore, 1973); *Alcaligenes*spp. (Hughes y Bayly, 1983); *Streptomyces* *setonii*(Antai y Crawford, 1983); *Bacillus* *stearothermophilus*(Gurujeyalakshumi y Oriel 1989); *Rhodopseudomonas palustres* (Rahalkar *et al.*, 1993); *Candida tropicales* (Neujahr y Gaal, 1999); *Trichosporon* *cutaneum*(Godjevargova *et al.*, 1998); *Aspergillus terreus* y *Geotrichum candidum*(García *et al.*, 1997) y *Rhodococcus chlorophenolicus*(Apalahati y Salkinoja, 1987), *Ochromonas danica*(Kirk y Ronald, 1996). En la tabla 1.1, se muestran algunos otros microorganismos degradadores de compuestos aromáticos tanto como consorcios como microorganismos puros.

Muchas son las bacterias existentes en los ecosistemas que pueden eventualmente transformar la mayoría de los compuestos tóxicos debido a la versatilidad de sus sistemas enzimáticos. La base fundamental, por tanto de la eliminación de compuestos orgánicos en sitios contaminados, es la capacidad de degradación que poseen los microorganismos autóctonos de los sitios impactados.

Los microorganismos usados mayormente para degradar compuestos son los microorganismo aerobios, debido a su eficacia para degradar los compuesto toxico y crecer más rápido que los anaerobios y alcanzando usualmente la mineralización completa del compuesto tóxico (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Compendio de autores y microorganismo que más refieren las bibliografías en trabajo con compuestos organoclorados.

Autores del trabajo	Microorganismo	Compuesto degradado
Nordin et al., 2005	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	4-Clorofenol
A.Backman y J,K,Jansson, 2004	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	4-Clorofenol
Caldeira et al.,1999	Comsorcio bacteriano	4-Clorofenol
Balfanz y Rehm, 1991	<i>Alcaligenes</i> sp. A7-2	4-Clorofenol
Werstmeier y Rehm, 1987	<i>Alcaligenes</i> sp. A7-2	4-Clorofenol
Werstmeier y Rehm, 1985	<i>Alcaligenes</i> sp. A7-2	4-Clorofenol
Saez y Rittmann, 1991	<i>Pseudomonas putida</i>	4-Clorofenol
JianYou et al., 2008	Cepa mutada de la radiación de <i>Candida tropicalis</i>	4-Clorofenol
Guang,Haulu et al., 2009	<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i> y <i>Mycopiana</i>	4-Clorofenol
Farrel y Quilty, 2002	<i>Pseudomonas putida</i>	2-Clorofenol
Farrel y Quilty, 1999	<i>Pseudomonas putida</i> +cultivo mixto	2-Clorofenol
Sayad, Ismaeil y El-Behih, 2009	<i>Bacillus subtilis</i> OS1	4-Clorofenol
Sayad, Ismaeil y El-Behih, 2009	<i>Alcaligenes</i> sp OS2	4-Clorofenol
Gallego et al., 2001	Cultivo puro de <i>Alcaligenes</i> sp	2-Clorofenol
Gallego et al., 2003	Genero <i>Alcaligenes</i> sp+ Cultivo mixto	2-Clorofenol

CAPITULO 2. METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

Esta investigación se realizó en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, en el periodo de Marzo de 2013 a Mayo 2014.

2.1 Materiales y Métodos

Los materiales y reactivos químicos usados en el experimento de validación por adecuación y en la degradación por el consorcio bacteriano RS-13 de 2-clorofenol y 4-clorofenol fueron suministrados por el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial.

2.1.1 Materiales

Reactivos químicos y soluciones

- ✓ Hidróxido de amonio NH_4OH : Tomar 35 mL de NH_4OH a 0.5N y diluir en 1 L de agua destilada.
- ✓ Tampón fosfato: Disolver 104.5 g de K_2HPO_4 y 72.3 de KH_2PO_4 en 1 L de agua destilada. Medir y ajustar pH a 6.8.
- ✓ 4-aminoantipirina 2 %: Pesar 2.0 g de 4-aminoantipirina y disolver en 100 mL de agua destilada.
- ✓ Ferrocianuro de Potasio 8 %: Pesar 8.0 g de Ferrocianuro de potasio y disolver en 100 mL de agua destilada.
- ✓ Solución de nitrato de plata al 0.0171 N: (Disolver 2.913 g de nitrato de plata en 1 L de agua destilada y envasar. Valore esta solución contra una de cloruro de sodio con 0.0171N.
- ✓ Suspensión de hidróxido de aluminio: (Disolver 125 g de sulfato de aluminio y potasio ($\text{AlKSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) en 1 L de agua destilada. Caliente a 60 °C y añada 55 mL de hidróxido de amonio concentrado, despacio y agitando. Dejar en reposo cerca de 1 hora y lavar el precipitado con sucesivas adiciones de agua destilada, hasta que quede libre de cloruros. Finalmente completar con agua destilada hasta 1 L.
- ✓ Peróxido de hidrogeno al 30 %.
- ✓ Solución indicadora de fenolftaleína.

- ✓ Solución indicadora de cromato al 5 %: Pesar 50 g de K_2CrO_4 y disolver en 1 L de agua destilada. Adicionar solución de $AgNO_3$ y espere formación de un precipitado de color rojo, luego de 12 horas filtrar y diluir en un 1 L de agua destilada.
- ✓ Estándar de cloruro de sodio 0.0141N: Disolver 824.0 mg de NaCl, secado a 140 °C y diluido en 1L de agua destilada. (1.00 mL=500 μ g Cl⁻).
- ✓ Solución 2 McFarland: Se mezcla $BaCl_2$ al 1% y H_2SO_4 al 1%. Luego de mezcladas ambas soluciones, son agitadas. Se compara la densidad del tubo muestra contra el patrón en tabla MacFarland (Anexo 2.1).
- ✓ Medio Mineral (MMS): Tampón fosfato 20mM (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7,2), 0,5 g.L⁻¹ de $(NH_4)_2SO_4$ y 0,2 g.L⁻¹ de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua destilada suplementada con 10 mL de una solución de elementos trazas. La solución contenía (en mg.L⁻¹) $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 600; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 200; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 20; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 40; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20; H_3BO_3 , 3; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 4 y fue acidificada con 1 mL de ácido sulfúrico concentrado por litro (Kröckel y col, 1987).

2.1.2 Métodos analíticos.

2.1.2.1 Método colorimétrico para la cuantificación de fenoles utilizando 4-aminoantipirina.

Fundamento del método

La cuantificación de compuestos fenólicos fue determinada por el método indirecto de la 4-aminoantipirina, según se reporta en el APHA, 2012, pero a un volumen de 5 mL. Para ello las muestras y patrones fueron ajustadas a $7,9 \pm 0,1$ unidades de pH, a la cual se hace reaccionar con la 4-aminoantipirina en presencia de Ferricianuro de Potasio, formando un compuesto antipirina coloreado que es mantenido en solución acuosa.

2.1.2.2 Método argentométrico para determinar cloruros.

El método se basa en la precipitación de cloruros de plata mediante la utilización de una solución de nitrato de plata de concentración conocida. Se empleó como indicador, cromato de potasio, el cual precipita como cromato de plata de color rojo, en medio neutro, inmediatamente después de precipitar todos los cloruros. (APHA, 2012).

Para la determinación, se toman 50 mL de la muestra o porciones menores se diluye en 50 mL con agua destilada, ajustar pH a 7 unidades con solución de H_2SO_4 ; se añade 1.0

mL del indicador cromato de potasio al 5% y se procede a la valoración con solución de nitrato de plata al 0.0171 N, agitando hasta la aparición de coloración rojo ladrillo.

La concentración de iones cloruros se determina mediante la ecuación 1.

$$CL = ((A-B) \cdot N \cdot 35,450) / M \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde: *Cl* es la cantidad de cloruros (mg.L^{-1}) expresado como cloruro de sodio; *A* son los mL de solución de nitrato de plata consumidos en la valoración y *B* son los mL de solución de nitrato de plata consumidos en la valoración del blanco. *N* es la concentración de la solución de nitrato de plata expresada en Mol.dm^{-3} . *M* es la cantidad de muestras (mL)

2.1.2.3 Determinación del crecimiento bacteriano por el método directo Viables.

El crecimiento microbiano se determinó por conteo de viables, preparando una serie de diluciones hasta 10^6 según el crecimiento microbiano y se sembró por diseminación por duplicado en placas con agar nutriente con 0.01mL de la solución escogida. Se incubó 24 horas y se leyó la cantidad de colonias crecidas. Se calculó la unidad formadora de colonias por mL (UFC/mL) de la muestra tomada graficando Log UFC/mL contra el tiempo (Horas) (Madigan y Col, 2003)

2.1.2.4 Determinación del porcentaje de degradación.

La remoción de los compuestos organoclorados en muestras fue monitoreada con un espectrofotómetro Rayleigh UV-2601 mediante la cuantificación de fenoles, según descrito en el apartado 2.1.2.1 determinando el porcentaje de degradación según lo expresado en la ecuación 2.

$$\% \text{ Degradación} = ((C_i - C_f) / C_i) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: *C_i* es la concentración inicial de fenoles y *C_f* es la concentración final.

2.2 Evaluación de la tolerancia de los aislados bacterianos ante el 2-clorofenol (2-CF).

La tolerancia de los aislados a concentraciones crecientes de 2-CF se evaluó por el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Sondossi y col, 1991). Para esto se preparó caldo nutriente con concentraciones crecientes del 2-CF partiendo de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ con incrementos a intervalos de 1 g.L^{-1} y se inocularon los aislados, incubándose a 32°C . Al

primero, segundo y séptimo día, se tomaron 10 μ L de los cultivos y se inocularon en placas con agar nutriente, incubándose durante 24 horas. La existencia de crecimiento en la placa se tomó como el resultado positivo de la prueba. Se consideró como CMI la concentración más baja del 2-CF donde no se observó crecimiento.

2.3 Adaptación del aislado bacteriano

La adaptación del aislado se llevó a cabo con la siembra en tubos con agar nutriente y clorofenol, incubando durante 24 horas (se trabajó 2-clorofenol a 25 y 55 mg.L^{-1} y 4-clorofenol a 40 y 65 mg.L^{-1}). El crecimiento fue recogido y lavado, el pellet obtenido se resuspendió en 50 mL de MMS con Glucosa al 1 % e incubado durante 24 horas a 35 °C. Pasada las 24 horas se centrifugó y se lavó 2 veces con MMS. Los pellet fueron resuspendidos en MMS suplementado con los compuestos clorofenólicos estudiados como única fuente de carbono y energía, incubándose durante 4 días. Pasada este tiempo fue recogido el crecimiento y lavado 2 veces con MMS. Se resuspendió hasta alcanzar una turbidez aproximadamente de 2 McFarland (*Manual of Clinical Microbiology*, 1999).

2.4 Degradación de compuestos organoclorados por el consorcio bacteriano RS-13.

La degradación se llevó a cabo en reactores (erlenmeyers) que fueron inoculados con 1 mL del inóculo adaptado. En este experimento se ensayaron dos concentraciones por cada compuesto organoclorado, en el caso del 2-clorofenol se usaron las concentraciones 25 mg.L^{-1} y 55 mg.L^{-1} y en el caso del 4-clorofenol se utilizaron las concentraciones 40 mg.L^{-1} y 65 mg.L^{-1} . Los erlenmeyers se incubaron a 35 °C, agitando a 105 rpm durante 120 horas. Cada variante fue ensayada por triplicado. Se utilizaron controles para evaluar la degradación abiótica de los compuestos. Se muestreó a intervalos regulares de 24 horas.

El crecimiento microbiano fue seguido por el método de conteo de viables y por lectura de la turbidez en la cual fue medida la densidad óptica de las muestras de cada reactor. La lectura se realizó a 660 nm contra blanco (agua destilada).

La degradación de los compuestos fue seguida utilizando el método argentométrico para evaluar la presencia y cantidad de iones cloruros. También se desarrolló la cuantificación de los fenoles totales mediante el empleo de la 4-aminoantipirina.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y **DISCUSIÓN**

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Validación por adecuación del método colorimétrico de la 4-aminoantipirina para la cuantificación de compuestos fenólicos.

La cuantificación de compuestos fenólicos y el seguimiento de su degradación puede ser evaluada a través de varios métodos analíticos, cuya selección depende de la matriz a analizar; entre estos se encuentran las técnicas colorimétricas FolinCicalteau, descrito fundamentalmente para muestras de fármacos (*United State Pharmacopeia, 2007, ICH Topic Q1 A, 2004*), el método Folin Denis (*Mattila and Kumpulainen, 2002*) y el método de la 4-aminoantipirina, descrito esencialmente para el estudio de muestras de aguas y aguas residuales, por medio de extracción con cloroformo (Método directo) o por medio del método indirecto (*APHA, 2012*).

El método 4-aminoantipirina, es el método estándar para la cuantificación de fenoles totales en muestras ambientales; se caracteriza como un método rápido y sencillo ya que no requiere de instrumental sofisticado. Su validación conducirá a la obtención de resultados precisos y exactos, con un alto grado de seguridad dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos.

Para la validación del método espectrofotométrico 4-aminoantipirina, se determinaron los parámetros establecidos en la norma cubana, llevando el método de la escala convencional a escala micro.

3.1.1 Linealidad

La linealidad del método se determinó por la recta de mejor ajuste, por medio del análisis de regresión de los mínimos cuadrados. La Figura 3.1 representa la curva de calibración a través de la cual se determina la linealidad del método al aplicar la regresión lineal para $n=10$ que dio origen a la recta de mejor ajuste. Se ensayaron muestras de concentraciones desde $1-5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Los resultados reflejan un coeficiente de correlación y de regresión lineal por encima de los límites establecidos ($r \geq 0,9989$ y $r^2 \geq 0,9978$) cuestión que indica una alta correspondencia entre la concentración y la respuesta analítica para las diez determinaciones realizadas, con 99 % de confiabilidad.

El estadístico r^2 (coeficiente de determinación) indica que el modelo ajustado explica el 99,89 % de la variabilidad observada, y el coeficiente de correlación con un valor de 0,9978, demuestra que existe una dependencia lineal entre la concentración y la señal

analítica en el intervalo evaluado; linealidad del método que es corroborada por el gráfico de los residuos (diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo ajustado) en función de la concentración (Figura 3.2).

En el análisis de varianza (Anova) del modelo de regresión, se obtuvo que el $F_{\text{calculado}} = 207,72$ y el $F_{\text{tabulado}} (P= 0,05) = 4,7E-3$ por lo que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabulado}}$, lo que demuestra que existe una buena correlación entre la absorbancia y la concentración, lo que permite evaluar la concentración de fenol por los valores de la absorbancia obtenidos.

3.1.2 Precisión y exactitud

La precisión de un método solo depende de la distribución de los errores aleatorios que no está asociada con el valor verdadero y se expresa generalmente como la desviación típica del resultado analítico. Tiene como objetivo conocer la variabilidad y los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo que no pueden ser siempre controlados (analista, equipo, instrumental, reactivos, tiempo, etc.) (NC-TS 368, 2010).

En este estudio, la precisión fue determinada a través de la repetibilidad, evaluando la variabilidad del método operado para el análisis a escala micro sobre la misma muestra, en las mismas condiciones de ensayo (analista, equipo y reactivos) y en el mismo laboratorio. La determinación fue realizada a través de la desviación típica relativa (CV) para cinco niveles de concentración que abarcaron el intervalo de concentración en que se encuentran las muestras a partir de una solución Stock de fenol ($1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), y en condiciones de repetitividad (Tabla 3.1). El coeficiente de variación obtenido para los cinco niveles de concentración evaluados fue de 0,02, mucho menor que lo permitido como límite para métodos espectrofotométricos ($< 3 \%$), lo que evidencia que el método estandarizado a escala micro es preciso para las concentraciones establecidas en las condiciones de trabajo ensayadas.

Los resultados de exactitud indican que un método analítico está próximo al valor verdadero, o al que se acepta convencionalmente como valor verdadero. Para determinar si el método es exacto se realizó la prueba de recuperación a 3 muestras con concentraciones iniciales de 1,06; 2,07 y 3,08 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, a las cuales se les añadió una cantidad conocida del analito, donde los porcentajes de recuperación obtenidos, oscilan entre 99,1 y 100,9 %, lo que sugiere que el método tiene buena exactitud. Para comprobar que la recuperación es satisfactoria se realizó una prueba-t donde se comparó la media de recobrado obtenida con respecto al 100 % (recobrado teórico). Debido a que el p-valor para esta

prueba es mayor o igual a 0,05 ($p = 0,0641$), no se rechaza la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95,0 % y por tanto se concluye que el porcentaje de recuperación obtenido (100,01) representa el 100 % de recuperación. La veracidad del método fue evaluada para cada concentración estudiada con un tamaño de muestra de $n=10$ (Tabla 3.2).

3.1.3 Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) ha sido definido como la menor cantidad de analito detectable pero no cuantificable por el método de análisis en una muestra, mientras que el límite de cuantificación o de determinación (LC) es el valor mínimo de analito cuantificable por el método en una muestra.

Para determinar los límites de detección y de cuantificación del método espectrofotométrico 4-aminoantipirina, se realizó la determinación de veinte muestras blanco de agua destilada. El límite de detección calculado fue de $0,052 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y el de cuantificación fue $0,62 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Ambos resultados confirman la utilidad del método para cuantificar pequeñas cantidades de fenoles en medio de cultivo (Tabla 3.3).

3.1.4 Robustez

Dado que el método de la 4-aminoantipirina se fundamenta en una reacción donde el ajuste de pH es fundamental para garantizar la formación del complejo coloreado entre el reactivo 4-aminoantipirina y el fenol presente en la muestra, condiciones significativas para la obtención de un buen resultado analítico; se comprobó la robustez del método por medio de un diseño factorial 2^2 , donde se evaluaron los factores: el volumen de buffer añadido y cantidad de reactivo como factores dependientes para el método ensayado, cuya variable de respuesta fue la concentración de fenoles totales.

Con los resultados del análisis ANOVA (Tabla 3.4), se pudo comprobar que ninguno de los factores estudiados, ni la combinación de estos, influye significativamente en los resultados analíticos del método ($p\text{-valor} > 0,05$) con un nivel de confianza del 95 %, lo que demuestra que el método de la 4-aminoantipirina es robusto frente a los factores estudiados. También el método se ha empleado con varias modificaciones en cuanto a concentración del reactivo precursor (4-aminoantipirina) (Botré C y col, 2009).

Los resultados revelan que el método analizado tiene la capacidad de permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros; es decir, capacidad que demuestra el procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto a las condiciones descritas en el método,

susceptibles de producirse durante su utilización, lo cual indica la fiabilidad o “estabilidad” durante su empleo en análisis de rutina.

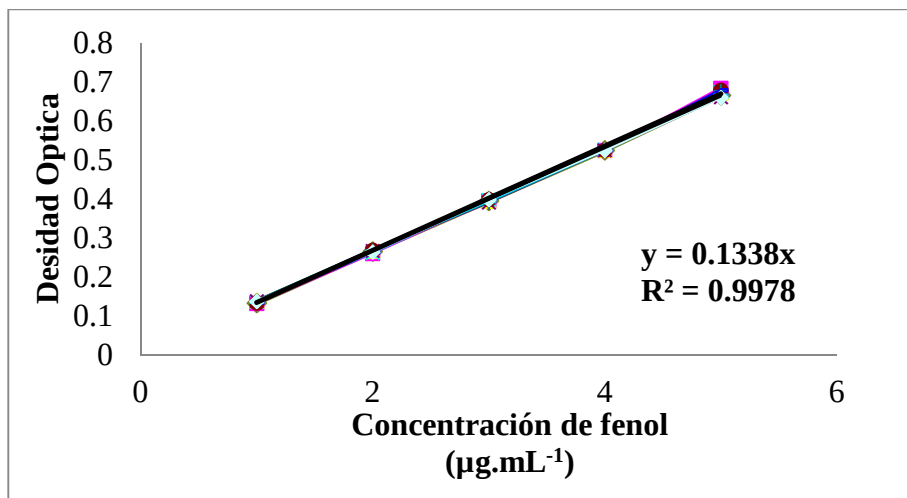


Figura 3.1. Curva de calibración para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos.

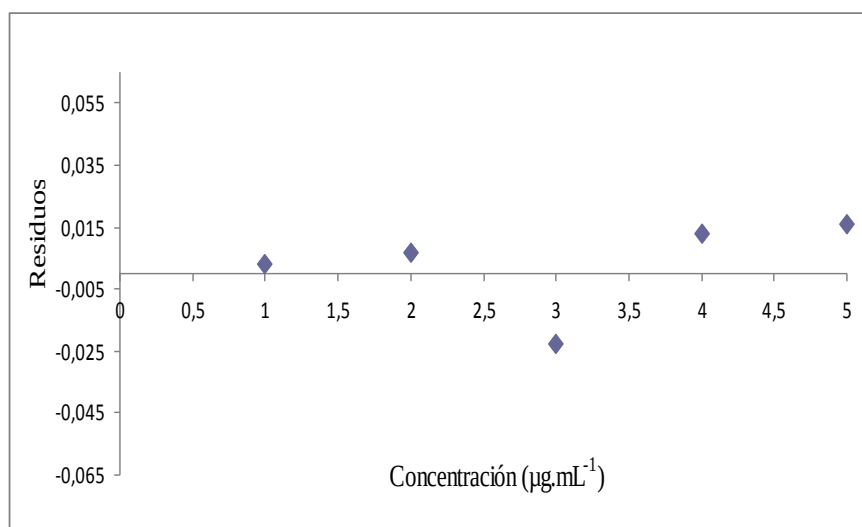


Figura 3.2. Gráfico de Residuos $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabla 3.1.Resultados del estudio de la precisión del método 4-aminoantipirina para la cuantificación de fenol.

Concentración de Fenol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Media ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (x) (n= 10)	Desviación Estándar (D.E)	Desviación típica relativa (% C.V)
1	0,1351	0,002766867	0,02048
2	0,2650	0,005333333	0,02013
3	0,3924	0,008682038	0,02213
4	0,4861	0,009926955	0,02042
5	0,6448	0,014195461	0,02202

Tabla 3.2.Porcentaje de recuperación obtenidos en el ensayo de la exactitud del método 4-aminoantipirina a escala micro.

Concentración patrón ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Cantidad añadida de analito (μg)	Conc. calculada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Recuperación
1,06	1,1	2,15	99,1
2,07	2,1	4,19	100,9
3,08	3,1	6,18	100
Media			100,01
CV %			0,00036

Tabla 3.3. Límites de determinación y cuantificación determinados para la cuantificación de fenoles por el método 4-aminoantipirina a escala micro. (Limite d y límite de c)

Parámetros	Valores
Nº de Muestras	20
Media ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0479
Desviación Estándar ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0013727
X _{MÁXIMA} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,049
X _{MÍNIMA} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,044
Límite de Detección ($x \pm 3 \text{ D.E}$) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0520181
Límite de cuantificación ($x \pm 10 \text{ D.E}$) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,061627

Tabla 3.4. Resultados del ANOVA para el ensayo de robustez del micro-método de la 4-aminoantipirina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cantidad de 4-aminoantipirina	0,00002112	1	0,00002112	0,01	0,9230
B:Cantidad de buffer	0,00177013	1	0,00177013	1,24	0,4662
AB	0,00177013	1	0,00177013	1,24	0,4662
Error total	0,00143113	1	0,00143113		
Total (corr.)	0,0160219	7			

3.1.5 Determinación de compuestos fenólicos en muestras de medio de cultivo.

Los compuestos organoclorados son tóxicos para la mayoría de los microorganismos a concentraciones superiores a $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$, de ahí que se considere un éxito encontrar bacterias que degraden completamente concentraciones cercanas a estas. Lo anterior justifica la búsqueda de bacterias degradadoras de éstos compuestos y su ensayo a concentraciones entre los 100 y $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Banerjee A y Ghoshal AK, 2010; Botré C y col, 2009; El-Sayed W y col, 2009; Ferreira G, 2010). Por tanto para el estudio se debe contar con métodos precisos que permitan de manera rápida y sencilla el monitoreo del proceso de degradación.

Partiendo de lo anterior, para la evaluación de la efectividad del método 4-aminoantipirina a escala micro, se procedió a cuantificar los fenoles en muestras incubadas en medio mineral salino con $80,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de 2-clorofenol e inoculada con el consorcio bacteriano RS-11 y RS-13.

La Tabla 3.5 muestra los valores de concentración antes y después del proceso de degradación, cuantificado a través del método evaluado; cuantificación que fue realizada ensayando muestras de cultivo en tiempo cero y transcurrida 48 h de experimentación. Se observó que pasada 48 h, la concentración del 2-clorofenol descendió en 40 y 30 % para RS-11 y RS-13 respectivamente. Lo que demuestra que las cepas no adaptadas a un compuesto tóxico, necesitan más tiempo para que su maquinaria enzimática esté lista para degradar el compuesto orgánico evaluado y así minimizar su toxicidad o utilizarlo como fuente de carbono; resultados similares obtuvo (Magdolna Z y col, 2013), cuando observó que a medida que aumentaba la concentración de 4-CF ($10, 100$ y $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) disminuía el porcentaje de degradación (88, 50 y 15 % respectivamente) durante un tiempo de incubación de 164 h (Magdolna Z y col, 2013; Singh S y col, 2009).

El coeficiente de variación de las determinaciones fue de 0,0041 y 0,0038 % para los cultivos con RS-11 y RS-13 respectivamente; demostrando que el método es efectivo para la cuantificación de fenoles totales en cultivos bacterianos, los cuales requieren de técnicas precisas y de poco volumen de muestra.

Tabla 3.5. Determinación de fenoles en medios de cultivos por los métodos 4-aminoantipirina a escala micro, antes y después del proceso de degradación por cepas del género *Bacillus*.

Nº de muestras	Nº de determinaciones	C ₀ (fenoles) (µg.mL ⁻¹)	C _f (fenoles) (µg.mL ⁻¹)	DS	CV (%)
1	5	80	32	0,016	0,0041
2	5	80	24	0,016	0,0038

Leyenda: C₀-Concentración inicial, C_f-Concentración final

3.2 Crecimiento del consorcio bacteriano RS-13 en 2-clorofenol y 4-clorofenol.

3.2.1 Evaluación de la tolerancia del consorcio bacteriano RS-13 en 2-clorofenol y 4-clorofenol.

La tolerancia de una bacteria a un compuesto muestra la capacidad que tiene para sobrevivir en presencia de dicho compuesto hasta una concentración determinada, es decir, el agente ensayado se comporta como bacteriostático, sin afectar la viabilidad aunque sí el crecimiento, mientras que a concentraciones superiores puede comportarse como bactericida o bacteriolítico (Madigan y Parker, 2000).

Existen varios métodos para evaluar la tolerancia que poseen los microorganismos a un compuesto químico determinado, en el presente trabajo se procedió inoculando los microorganismos en placas agarizadas con el producto a evaluar y observar si existe crecimiento pasado los siete días de incubación (Godoy y col, 1999; Matafonova y col, 2006; Matafonova y col, 2007; Singh y col, 2009; Banerjee y Ghoshal, 2010). El método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) no es capaz de distinguir entre capacidad cida o estática pues sólo evalúa la concentración a la que no se observa crecimiento. Sin embargo, el método empleado, reportado por Sondossi, las evalúa de manera diferenciada permitiendo separar ambas capacidades, siendo capaz de evidenciar si las bacterias resisten a las condiciones impuestas, al valorar el crecimiento de la misma en un medio general sólido sin el tóxico.

En este sentido el ensayo mostró que el consorcio RS-13 tuvo una tolerancia de 8.0 mg.L⁻¹ para 2-clorofenol y 4-clorofenol, lo que evidencia que dicho consorcio es aceptable y que las bacterias que lo componen puede ser capaz de sobrevivir en condiciones con altas concentraciones de estos compuestos (Figura 3.3 y 3.4).

La literatura refiere la tolerancia asociada a la capacidad de observar crecimiento en los diferentes compuestos fenólicos de varias bacterias como son: *Bacillus cereus* hasta 0,09 g.L⁻¹ de 2,4-diclorofenol (Matafonova y col, 2006; Matafonova y col, 2007); dos aislados de *Bacillus sp.* hasta 0,3 g.L⁻¹ de 2-clorofenol (Al-Thani y col, 2007), *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 hasta 0,3 g.L⁻¹ de 4-clorofenol (Nordin y col, 2005), *B. cereus* y *Paenibacillus sp.*, entre 0,1 - 0,5 g.L⁻¹ de fenol (Singh y col, 2009), así como *Pseudomonas sp* hasta 0,5 g.L⁻¹ de fenol (Banerjee y Ghoshal, 2010). Lo anterior ejemplifica la relación que puede existir entre la complejidad de la estructura del compuesto y la capacidad de crecer en su presencia.

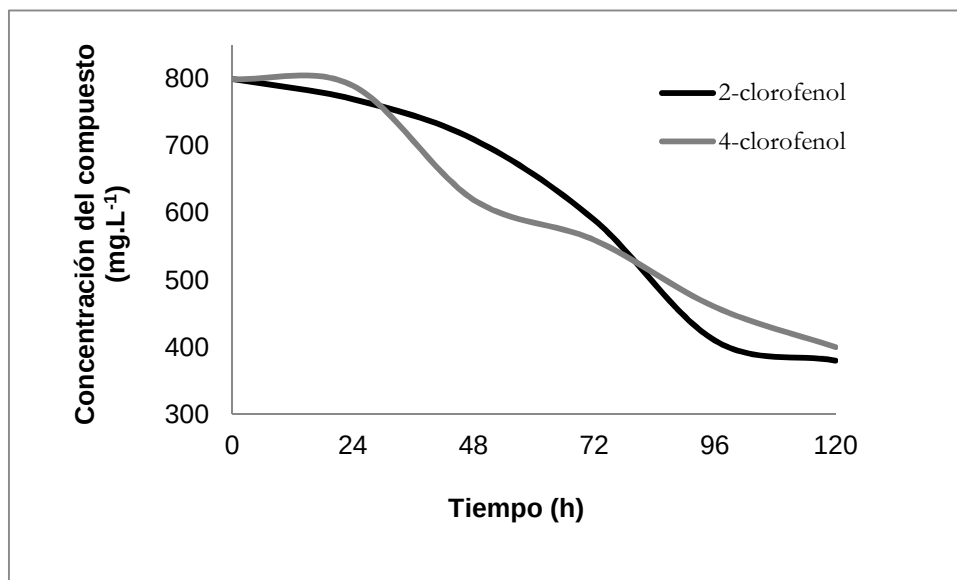


Figura 3.3. Tolerancia del consorcio bacteriano RS-13 al 2-clorofenol y 4-clorofenol.

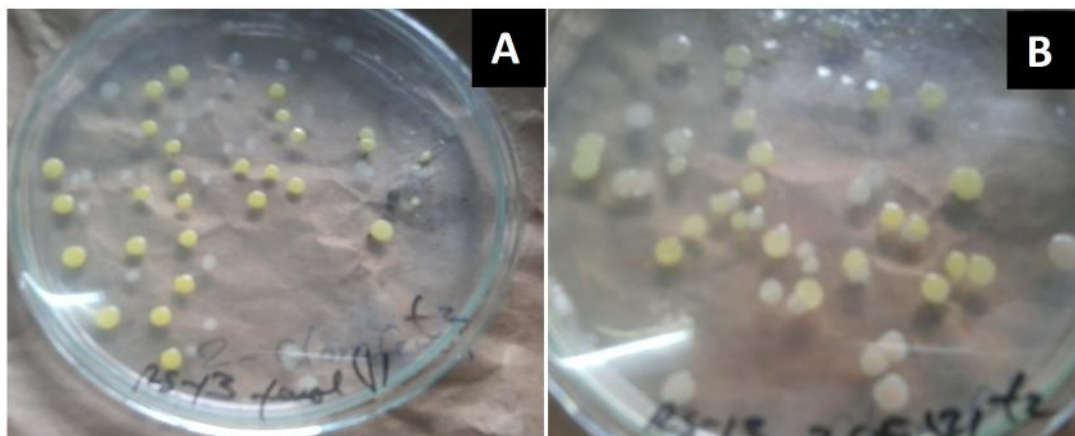


Figura 3.4. Crecimiento de RS-13 sobre placa agarizada suplementada con 2-clorofenol y 4-clorofenol.

Los compuestos fenólicos tienen la habilidad de interrumpir las funciones de la membrana, produciendo la muerte celular (*Lin y col, 2008*). Su principal modo de acción es el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, aspecto en el cual también incide el grado de cloración, siendo este efecto menor para monoclorados como el 2-clorofenol y el 4-clorofenol, respecto a los policlorados como el pentaclorofenol (*Häggblom y Valo, 1995*). También se ha mostrado que el crecimiento microbiano y la degradación de los compuestos fenólicos se dificulta por la toxicidad del sustrato cuando aumenta su concentración (*Kargi y Eker, 2005*).

Los mecanismos de resistencia a tóxicos han sido estudiados en detalles para los antibióticos y se piensa que la resistencia a compuestos orgánicos y solventes sea por mecanismos similares (*Pandey y col, 2009*). Varios autores sugieren que esta resistencia está basada en cambios morfológicos y fisiológicos. La toxicidad de los compuestos orgánicos se debe entonces a su acumulación dentro de la membrana celular.

El primer mecanismo desarrollado por las bacterias, puede ser incrementar la rigidez de la membrana y disminuir su permeabilidad química. Otro mecanismo puede ser expulsar el tóxico por medio de bombas dependientes de energía (transporte activo), cuyo objetivo es mantener la concentración del compuesto dentro de niveles subtóxicos para el organismo (*Pandey y col, 2009; Ramos y col, 2002; Chavez y col, 2006*). Los mecanismos mencionados puede explicar la alta tolerancia encontrada en el consorcio estudiado (RS-13) que pasadas las 120 logra degradar h de incubación aproximadamente el 50 % de los compuestos. RS-13 procede de terreno con una contaminación de larga data, es un consorcio bacteriano que lleva mucho tiempo habitando estos ecosistemas impactados con hidrocarburos, por lo que es lógico encontrar especies con características metabólicas y genotípicas adaptadas a estas condiciones.

3.2.2 Crecimiento de RS-13 sobre el 2-clorofenol y 4-clorofenol.

El crecimiento microbiano fue determinado a través del conteo y mediante la lectura de la turbidez, realizado a varios intervalos tiempo para un tiempo total de experimentación de 120h. Se ensayaron dos niveles de concentración para cada compuesto estudiado, 25 y 55 mg.L⁻¹ para 2-clorofenol y 40 y 65 mg.L⁻¹ para 4-clorofenol.

Las curvas de crecimiento obtenidas por el conteo de viables, evidencian el crecimiento exponencial del consorcio sobre ambos compuestos. El consorcio RS-13 crecido sobre 25 y 55 m.L⁻¹ muestra un comportamiento similar, en las primeras 24 h, hubo un crecimiento en el número de células, tiempo a partir del cual se observa un comportamiento lineal pero en descenso hasta las 72 h en que se mantiene con poca variación, siendo mayor para 55 mg.L⁻¹ (Figura 3.5).

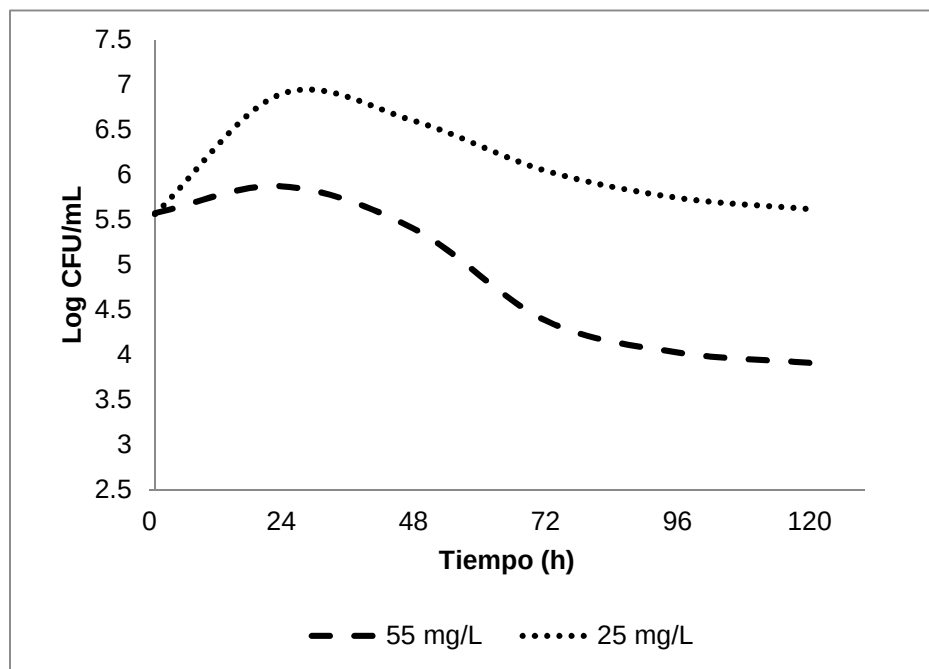


Figura 3.5. Crecimiento del consorcio RS-13 sobre 2-clorofenol.

El análisis de la turbidez del medio refiere muerte para una parte de los microorganismos al entrar en contacto con el compuesto ensayado. El crecimiento observado posterior a las 8 h es producto de la bacterias que sobrevivieron a la concentración utilizada del tóxico, pasada las 24 h. El ensayo con 25 mg.L⁻¹ de 2-clorofenol mostró un incremento en la densidad óptica en relación con el tiempo, mayor que lo observado cuando se ensayó a la concentración de 55 mg.L⁻¹. En ambos casos existe una diferencia estadísticamente significativa en la variación de este parámetro en función del tiempo (Anexo 3.1). La forma irregular de la curva sugiere un crecimiento por formación de flóculos, que no fueron observables en las primeras horas, pero sí a partir de las 16 h con un tamaño pequeño que fue aumentando y por tanto haciéndose visible hasta el final del tiempo de experimentación (Figura 3.6 y 3.7).

Farrel y Quilty (2002) experimentando con *Pseudomonas putida*, encontraron que la misma formaba flóculos en presencia de 2-clorofenol a concentraciones de 100 y 200 mg.L⁻¹, sin embargo no observaron a 50 mg.L⁻¹. En cambio, en este trabajo se evidenció la aparición de floculos con el consorcio RS-13 a concentraciones de 25 y 55 mg.L⁻¹, siendo más pequeños a menor concentración del compuesto, lo cual discrepa con lo referido por los autores antes mencionados. El aislado RS-13, cuando crece en caldo nutriente en condiciones estáticas forma una película en la superficie del medio, lo cual pudiera ser la explicación de la aparición de flóculos en el medio de degradación en condiciones estáticas. Según Alexander (1994) el proceso de muerte celular es apreciable, en la aclimatación de microorganismo, cuando crecen en fenol durante las primeras horas de estar en contacto con el medio, utilizando luego la fuente de carbono disponible durante la fase de crecimiento. La tendencia descrita anteriormente se apreció en el experimento realizado con 2-clorofenol a las diferentes concentraciones ensayadas (25 y 55 mg.L⁻¹).

En el caso del 4-clorofenol se observó un incremento de la densidad óptica a la concentración de 60 mg.L⁻¹; Sayed y col. (2009), explican en su trabajo que concentraciones superiores 60 mg.L⁻¹, inhiben el crecimiento del microorganismo por la toxicidad del compuesto al crecimiento celular (Figura 3.8). El 4-clorofenol a concentraciones de 40 y 65 mg.L⁻¹, muestra mejor tendencia lineal ($R^2=0,57-0,67$) que el 2-clorofenol ($R^2=0,22-0,39$), evidenciando una menor formación de floculos (datos no mostrados). El consorcio RS-13, tuvo un crecimiento exponencial (Figura 3.9), siendo superior para la concentración de 65 mg.L⁻¹ con una $\mu=0,091\text{ h}^{-1}$ y $\mu=0,05\text{ h}^{-1}$ para 40 mg.L⁻¹.

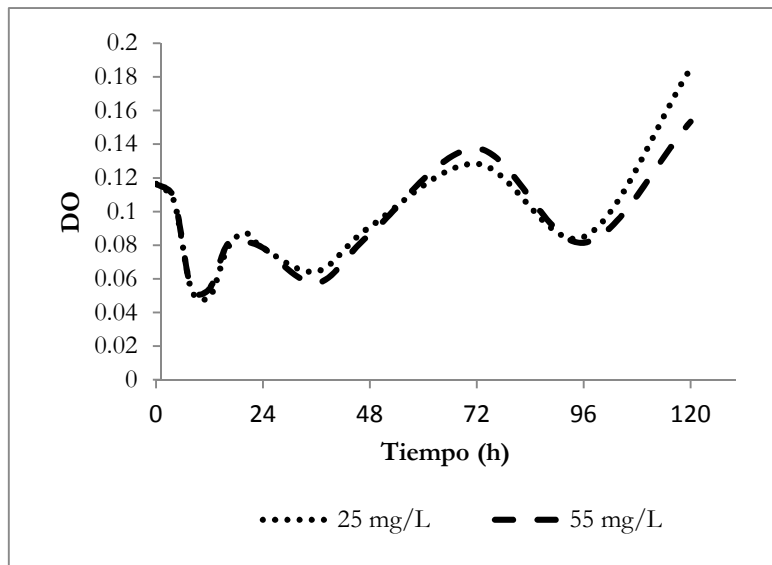


Figura 3.6. Comportamiento del parámetro turbidez en RS-13 en 2-clorofenol.



Figura 3.7. Muestra del crecimiento (formación de flóculos) del consorcio RS-13 sobre el 2-clorofenol.

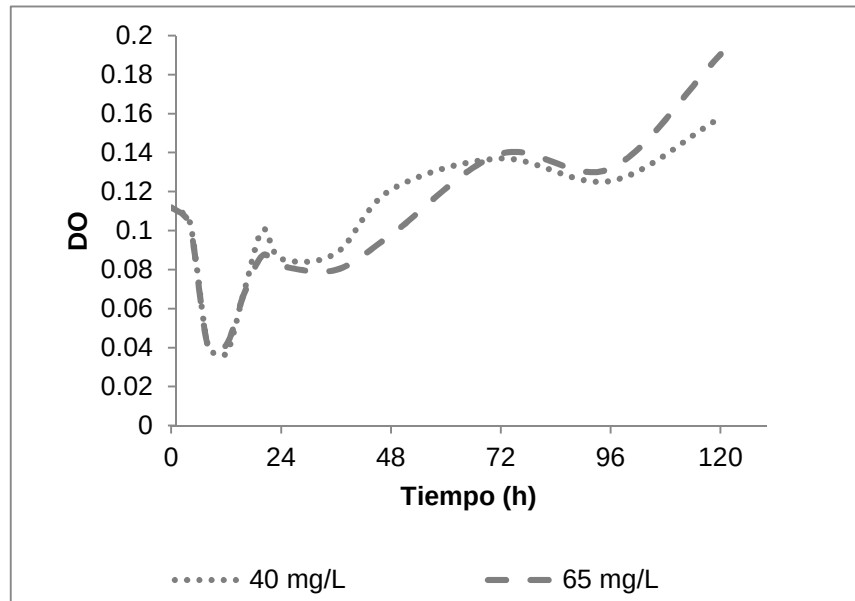


Figura 3.8. Comportamiento del parámetro turbidez en RS-13 en 4-clorofenol.

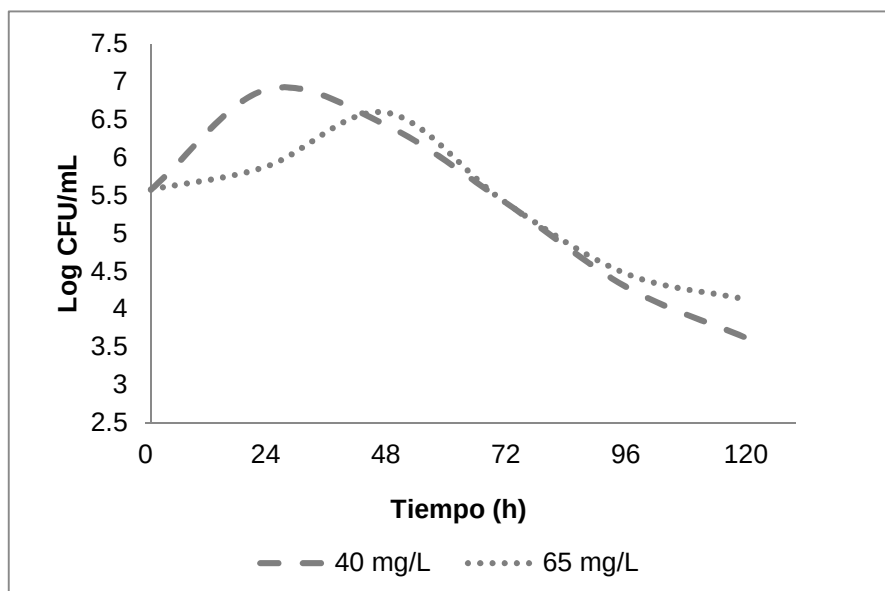


Figura 3.9. Crecimiento del consorcio RS-13 sobre 4-clorofenol.

3.3 Degradación de 2-clorofenol y 4-clorofenol por el consorcio bacteriano RS-13.

Kwon y Yeon (2009) refieren los microorganismos al crecer en fenol pasan por dos etapas la primera el microorganismo secreta enzimas que estimula la degradación de dicho compuesto y la segunda ocurre por medio de cambios en la estructura de la membrana originado por el tóxico, lo que explica la demora en el comienzo de la degradación de este y otros compuestos similares, lo que se considera como la adaptación del microorganismo a este compuesto.

En el presente trabajo la degradación del 2-clorofenol por el consorcio bacteriano RS-13 a la concentración de 25 y 55 mg.L⁻¹, se desarrolló con mayor éxito a la concentración de 25 mg.L⁻¹, donde los niveles de concentración de fenoles tienden a la disminución según se muestra en la figura 3.9.

La concentración del 2-clorofenol, transcurridas las primeras 24 h alcanzó valores de 13 y 24 mg.L⁻¹ para 25 y 55 mg.L⁻¹ de concentración inicial respectivamente; transcurridas las 120 h de experimentación se logra un descenso de la concentración hasta 8 y 13 mg.L⁻¹, respectivamente (Figura 3.10).

Hay trabajos que refieren que *Pseudomona putida* degradó 200 mg de 2-clorofenol en tan solo 48 horas (Farrel and Quilty, 1999); estos mismos autores trabajaron la cepa de *Pseudomona putida* de conjunto con un cultivo mixto para degradar 200 mg.L⁻¹ de 2-clorofenol, logrando la degradación total en 124 h de experimentación (Farrel and Quilty, 2002). Gallego et al, 2001, degradó con un cultivo puro de bacterias del género *Alcaligenes* sp un 98.5 % de 100 mg de 2-clorofenol. También logró degradar con el cultivo de *Alcaligenes* sp 92.5 % de 100 mg de 2-clorofenol y con un cultivo mixto de bacterias 99.8 % de 100 mg de este compuesto en 36 horas (Gallego et al, 2003); estos resultados son superiores a los alcanzados en este trabajo, donde solo se logra degradar el 70 y 76 % para 25 y 55 mg.L⁻¹ de concentración de partida (Figura 3.11), cuestión que puede estar dada por el tiempo de adaptación realizado al consorcio estudiado y por el tamaño del inóculo de partida. Según la ecuación de correlación de la degradación en función del tiempo, se determinó que con las concentraciones ensayadas de 2-clorofenol se logra una degradación total en 144 h.

En los ensayos de degradación la temperatura juega un papel fundamental en dependencia del tipo de microorganismo, en este trabajo la temperatura fue 35 °C y se mantuvo estable durante las 120 h; sin embargo Gallego y col. (2003) trabajaron a temperatura de 28 °C.

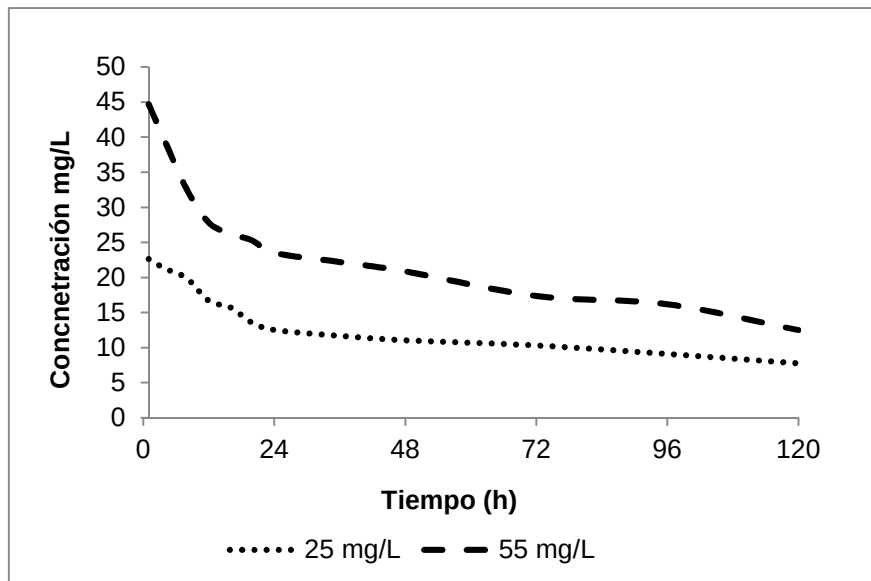


Figura 3.10. Degradación del 2-.clorofenol por el consorcio bacteriano RS-13.

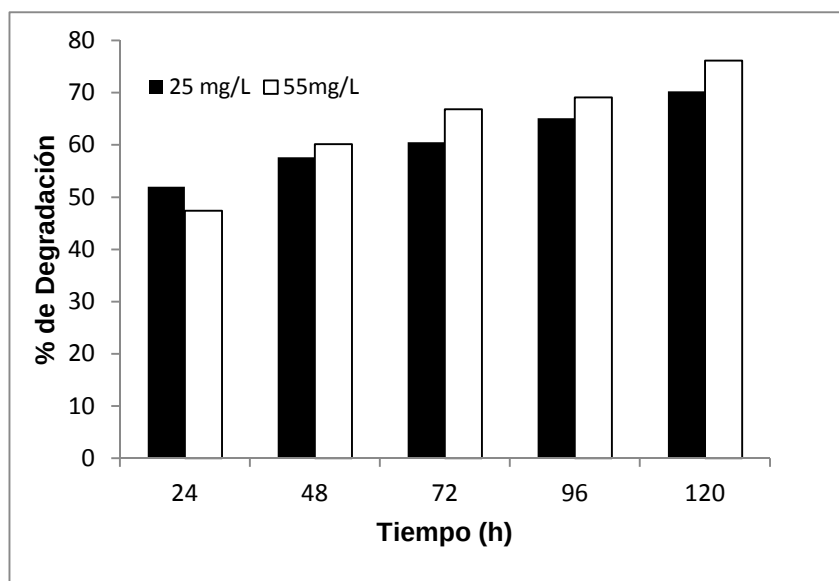


Figura 3.11. Variación del porcentaje de degradación de 2- clorofenol por el consorcio bacteriano RS-13.

La degradación de 4-clorofenol fue ensayada en 40 y 65 mg.L⁻¹, cuyo comportamiento fue inferior que en 2-clorofenol, logrando a las primeras 24 h una disminución 13 y 33 mg.L⁻¹ para un porcentaje de degradación de 33 y 50 % respectivamente (Figura 3.12). Por tanto se observó que el crecimiento del consorcio RS-13 a la concentración superior es mucho más rápido. Según El-Sayed y col. (2009) la degradación del 4-clorofenol tiene un rango óptimo de 20 a 60 mg.L⁻¹, para *Alcaligenes sp* la cual degradó totalmente la concentración inicial en tan solo 30 h; en este trabajo el consorcio utilizado (RS-13) degradó en las primeras 24 horas 13 mg.L⁻¹ de la concentración inicial de 4-clorofenol, llegando a degradar a las 120 h 26 mg.L⁻¹ de los 40 mg.L⁻¹ que existían inicialmente. Los porcentajes de degradación fueron de un 32 a 65 % para la concentración inicial de 40 mg.L⁻¹ mostrando una tendencia a necesitar 192 h para degradar totalmente los miligramos de 4-clorofenol utilizados.

El porcentaje de degradación alcanzado para las concentraciones ensayadas fue superior al 50 % en ambos casos, logrando degradar 65 y 61 % respectivamente, transcurridas las 120 h de experimentación; sin embargo, al comparar el comportamiento frente a ambas concentraciones, se observó que con 65 mg.L⁻¹ la variación de la concentración de clorofenol en el medio fue baja a partir de las 48 h en que superó el 50 % de degradación, logrando degradar hasta un 61 % a las 120 h de experimentación lo que mostró un enlentecimiento de la velocidad de degradación. (Figura 3.13) .

Al analizar el comportamiento de la relación entre la degradación de los compuestos 2-clorofenol y el 4-clorofenol con la liberación del ión cloruro, se conoce que existe una relación molar cloruro-monoclorofenol de 1:1, por lo que es de esperar que cada mol de cloruro liberado corresponda a 1 mol de clorofenol degradado.

La degradación del 2-clorofenol está relacionada con la liberación del ión cloruro, relación que en su inmensa mayoría se cumple. Partiendo del 2-clorofenol a diferentes concentraciones y asumiendo que la degradación del mismo ocurre por la vía orto (Anexo 3.2), el primer intermediario es el 3-clorocatecol, formándose por la acción de la enzima fenol-hidrolasa, a partir del cual ocurren diferentes reacciones; en este caso el segundo intermediario es la 5-cloromucolactona, que en este trabajo se sugiere que actúa como represor de la enzima 1,2-clorocatecoldioxigenasa, según lo observado en el Figura 3.14.

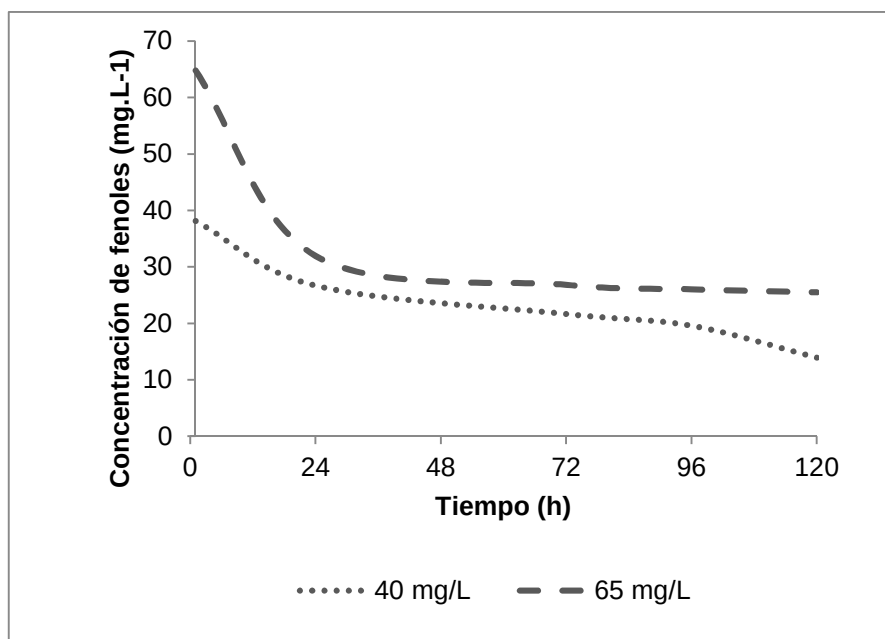


Figura 3.12. Degradación del 4-clorofenol por el consorcio bacteriano RS-13.

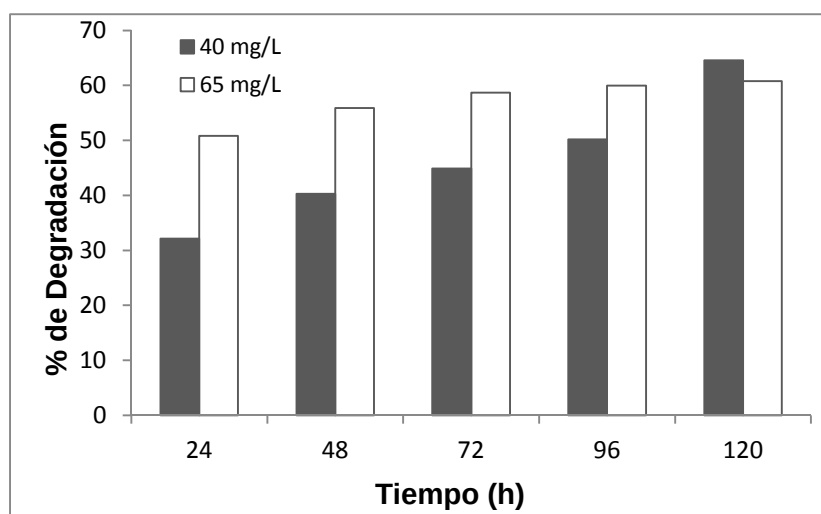


Figura 3.13. Porcentaje de degradación del 4-clorofenol por el consorcio bacteriano RS-13.

La degradación del 2-clorofenol es de un 52 % en las primeras 24 h, llegando a las 120 h con un 70 % de degradación lo que sugiere que el mecanismo se enlenteció durante las últimas 96 horas, no así para la liberación del ión cloruro, la cual se mantuvo a velocidad constante a razón de 20 μM cada 24 h, hasta que culminó el experimento (Figura 3.14).

Este comportamiento demostró que la degradación del 2-clorofenol a concentraciones de 25 mg.L^{-1} fue efectiva durante las primeras 24 horas, no así la liberación del ion cloruro que comenzó apenas se alcanzaron los valores de concentración de fenoles totales =105 μM (Figura 3.15), lo que sugiere que la liberación del ion cloruro se activa a partir de las 48 horas. Estos resultados sugieren que un intermediario (que sería 2-cloro-cis,cis-muconato), esté actuando como represor de la 1,2-clorocatecoldioxigenasa permitiendo su activación cuando este intermediario disminuya su concentración intracelular, lográndose un estado estacionario o de equilibrio dinámico en el microorganismo, que le permite continuar la degradación del clorofenol, como única fuente de carbono disponible en el medio de cultivo (Anexo 3.2). La liberación de cloruro se comporta de manera aproximadamente lineal con el tiempo de fermentación ($R^2=0.986$), lo que corresponde a una situación en la cual la enzima implicada en la reacción de liberación del ión cloruro se encuentra saturada por sus sustrato. Este comportamiento es similar a lo ocurrido a concentraciones de 50 mg.L^{-1} .

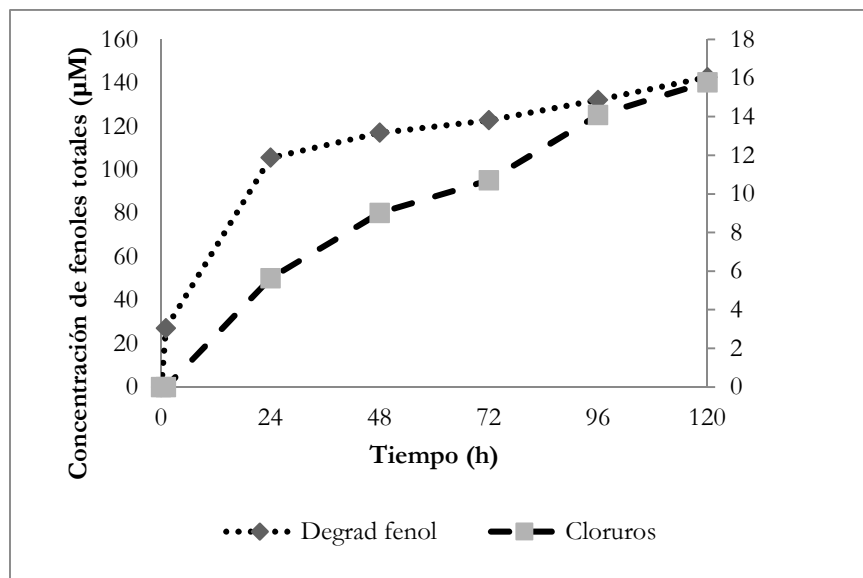


Figura 3.14. .Degradación del 2-clorofenol atendiendo a la concentracón del ion cloruro y el 2-clorofenol en μM

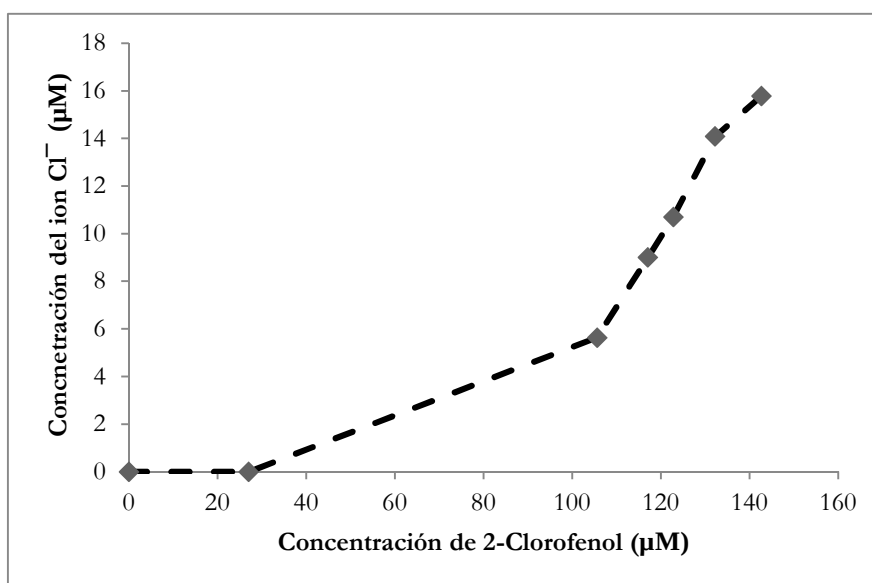


Figura 3.15. Correlación de la concentracón del ion cloruro y el 2-clorofenol en μM durante el transcurso del experimento.

El 4-clorofenol a 40 y 65mg/L⁻¹ (300μM y 490 μM de concentración inicial) mostró (Figura 3.16) que la velocidad de degradación a 40 mg.L⁻¹ presenta un comportamiento decreciente con el tiempo de fermentación, de igual modo que para la concentración de 65mg.L⁻¹, aunque en este último caso, esta desaceleración es mucho más pronunciada. La liberación del ión cloruro comenzó a observarse apenas se alcanzaron los valores de concentración de fenoles totales (100 μM), lo que sugiere que la degradación del cloruro se activa a partir de las 24h. En este caso se observó que a medida que se fue degradando el compuesto organoclorado, se liberó el ión cloruro, manteniendo el equilibrio en el microorganismo que le permite continuar con la degradación del clorofenol como única fuente de carbono disponible en el medio. La liberación de cloruro mantiene también un comportamiento lineal ($R^2= 0.966$) en el tiempo, lo que demuestra que a medida que aumenta los valores de concentración del compuesto organoclorado incrementa la liberación del ión cloruro en función del tiempo (Anexo 3.3).

Este comportamiento coincide con el criterio de El-Sayed y col. (2009) los que sugieren que la concentración óptima para degradar 4-clorofenol está entre 20 y 60 mg.L⁻¹, también cabe destacar lo planteado por Farrel y Quilty (2002) que enuncian que la degradación del 4-clorofenol es más fácil, seguida del 2,4-diclorofenol y por último el 2-clorofenol, lo cual está dado a la ubicación que presenta el átomo de cloro en el fenol.

La liberación de cloruro en ambas concentraciones de 40 y 65 mg.L⁻¹ de 4-clorofenol, presentó un comportamiento diferente en ambos casos, como se expresó anteriormente. El 4-clorofenol a concentración de 65 mg.L⁻¹ (Figura 3.18) necesita alcanzar una degradación del fenol del orden de 240 μM como condición para activar la enzima implicada en la liberación del átomo de cloro asociado al compuesto intermedio clorado.

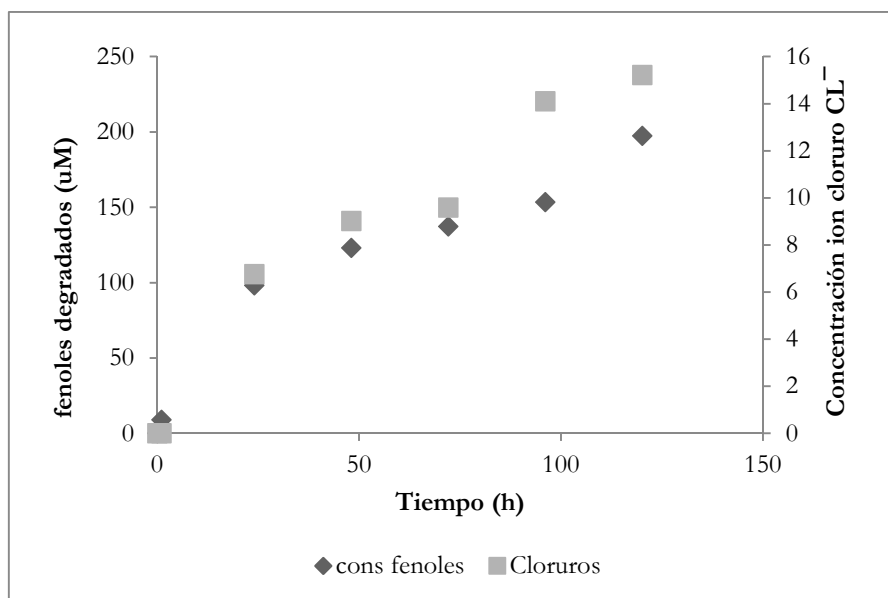


Figura 3.16. Comportamiento de correlación entre la concentración de fenoles totales y la concentración el ión cloruro liberado a 40 mg.L^{-1} .

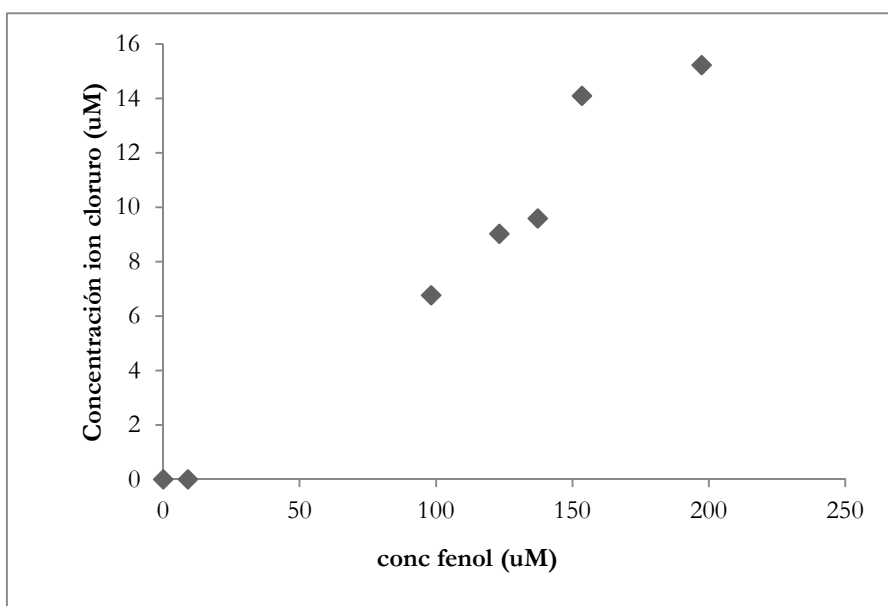


Figura 3.17. Comportamiento de correlación entre la concentración de fenoles totales y la concentración el ion cloruro liberado a 40 mg.L^{-1} .

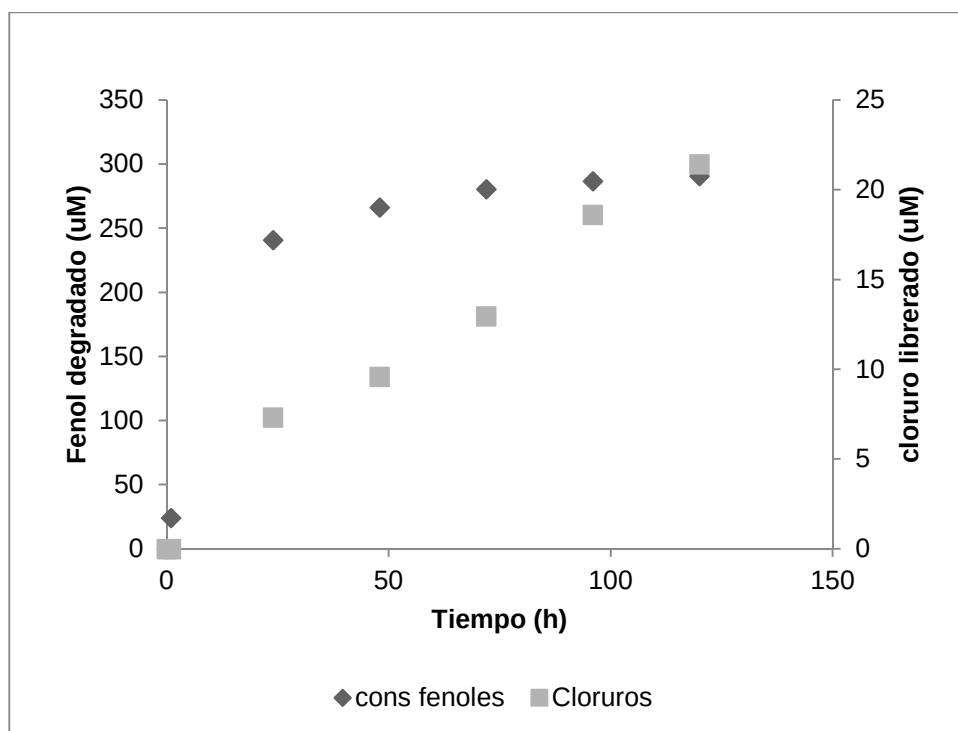


Figura 3.18. Comportamiento de correlación entre la concentración de fenoles totales y la concentración el ion cloruro liberado a 65 mg.L⁻¹.

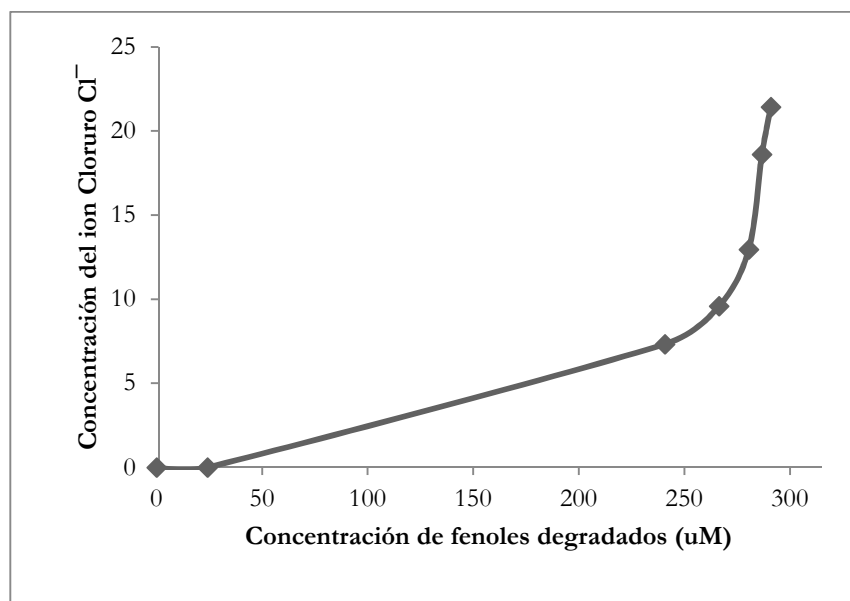


Figura 3.19. Comportamiento de correlación entre la concentración de fenoles totales y la concentración el ion cloruro liberado a 65 mg.L⁻¹.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Se validó el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina por adecuación para la cuantificación de compuestos organoclorados en muestras ambientales, con un límite de detección de 0.052 mg.L^{-1} y el límite de cuantificación 0.62 mg.L^{-1} .
- 2) El consorcio bacteriano RS-13 es capaz de tolerar concentraciones de 800 mg.L^{-1} de 2 y 4-Clorofenol, mostrando una degradación superior al 50 % en los niveles de concentración ensayados.
- 3) La degradación de fenol muestra una correlación positiva con la liberación de ión cloruro, observándose cinéticas similares en 2-Clorofenol a concentraciones de 25 y 55 mg.L^{-1} y del 4-clorofenol a 65 mg.L^{-1} .

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

- 1) Continuar con la adaptación del consorcio estudiado a otros niveles de concentración de 2 y 4-Clorofenol.
- 2) Profundizar en el análisis de las rutas metabólicas asociado a la degradación de compuestos organoclorados, identificando las enzimas que intervienen en el proceso de degradación.
- 3) Dar seguimiento de los productos formados por métodos cromatográficos.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- ✓ Gallego *et al.* 2003. Biodegradation and detoxication of phenolic compounds by pure and mixed indigenous cultures in aerobic reactors. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52:261 – 267.
- ✓ El Sayed W, Ismaeil M y El-Behih F. 2009. Isolation of 4-Chlorophenol-Degrading Bacteria, *Bacillus subtilis* OS1 and *Alcaligenessp.* OS2 from Petroleum Oil-Contaminated Soil and Characterization of its Catabolic Pathway. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2): 776-783
- ✓ Farrel y Quilty.1999. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a *meta*- cleavage pathway. *Biodegradation*, 10: 353–362
- ✓ Farrel y Quilty.2002-----Farrell A, Quilty B. 2002. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of monochlorophenols and phenol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28:316-324.
- ✓ G. Lu, C. Wang, y Z. Sun. 2009. Biodegradation of Complex Bacteria on Phenolic Derivatives in River Water. *Biomedical And Environmental Sciences*, 22: 112-117
- ✓ Chu-Fang Yang y Chi-Mei Lee. 2008. Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium* sp. 4-CP-20. *Biodegradation* 19:329–336
- ✓ Caldeira *et al.* 1999. 4-Chlorophenol degradation by a bacterial consortium: development of a granular activated carbon biofilm reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 52: 722-729
- ✓ Nordin K, Unell M, Jansson J. 2005. Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacterchlorophenolicus* A6. *App. Environment Microbiol.* 71(11):6538-6544.
- ✓ Pieper D. 2005. Aerobic degradation of polychlorinated biphenils. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67:170-191.
- ✓ Fetzner S, Lingens F. 1994. Bacterial dehalogenase: biochemistry, genetics and biotechnological applications. *Microbiological Review.* 58(4):641-685.
- ✓ ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Comprehensive Enviromental Response, Compensation and Liability Act (CERCLA) priority list of hazardous substances.2005. En: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>.

- ✓ Annachhatre AP, Gheewala SH. 1996. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds .Biotechnology Advance 14:35-36
- ✓ Banerjee A, Ghoshal AK. 2010. Isolation and characterization of hyper phenol tolerant *Bacillus* sp. from oil refinery and exploration sites. *Journal of Hazardous Materials*.176:85-91.
- ✓ Gallego, 2001--- Gallego A, Gómez CE, Fortunato MS, Cenzano L, Rossi S, et al. (2001). Factors affecting biodegradation of 2-chlorophenol by *Alcaligenes* sp. in aerobic reactors. *Environmental Toxicology*. 16(4):306-13.
- ✓ Kristiansen y col, 1994Kristiansen NK, Froshaug M, Aune KT, Becher G, Lundades E. Identification of halogenated compounds in chlorinated seawater and drinking water produced offshore using n-pentane extraction and open-loop stripping technique. *Environ. Sci. Technol*. 1994; 28:1669-1673.
- ✓ Gabriela Zafra Jimenez.2010.Aislamiento de bacterias aerobias que degradan compuestos fenólicos y organoclorados con características fenotípicas. Tesis de Maestría. Universidad de México. Faculta de Ciencias UNAM.
- ✓ Flerov, BA. 1973. Phenol intoxication in fish. *Abstract: ChemicalAbstracts*. 80:78848r.
- ✓ Buikema AL, MK McGinniss and J Cairns JR. 1979. Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review or recent literature. *Marine Environment and Resources*. 2:87-121.
- ✓ Patrick R. Murray. Manual of Clinical Microbiology. Ed ASM Press: Washington, DC.7th edition. 1999.
- ✓ Godoy F, Zenteno P, Cerda F, González F, et al. 1999. Tolerance of trichlorophenols in microorganisms from a polluted and a pristine site of a river. *Chemosphere*. 38(3):655-662.
- ✓ Sondossi M, Sylvestre M, Ahmad D, Massé R. 1991. Metabolism of hydroxybiphenyl and chloro-hydroxybiphenyl chlorobiphenyl degrading *Pseudomonas testosteroni*, strain B-356. *J IndMicrobiol*. 7:77-89.
- ✓ Alexander M. Biodegradation and bioremediation. Ed. Academic Press, California, USA, 1994. Cap 3. Pp16-40.
- ✓ Banerjee A, Ghoshal AK. 2010. Isolation and characterization of hyper phenol tolerant *Bacillus* sp. from oil refinery and exploration sites. *Journal of Hazardous Materials*. 176:85-91.

- ✓ DH, Holt JG. Bergey`s. Manual of determinative bacteriology. 9th edition. Ed. Hensyl WR. Lippincott Williams & Wilkins, New York. 1994.
- ✓ Kröckel L, Focht D. 1987. Construction of Chlorobenzene-utilizing recombinants by progenitive manifestation of a rare event. *Appl Environ Microbiol.* 53(10): 2470-2475.
- ✓ Kyung Han Kwon y Sung. HoYeom. 2009. Optimal microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:435-442.
- ✓ Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antibacterial susceptibility Test: Dilution and disk diffusion methods. In: *Manual of Clinical Microbiology*. 7th edition. Ed. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al. ASM Press edit. 1999; cap 18. Pp1526-1533.
- ✓ Madigan MT, Martinko JM, Parker J. “*Brock Biology of Microorganisms*”. 9na edition. Ed Prentice Hall. 2000; Cap 2. Pp.60.
- ✓ Matafonova G, Shirapova G, Zimmer Ch, Kohring G, et al. 2007. *Bacillus cereus* is a microbial decomposer of 2,4-dichlorophenol. *Biology Bulletin.* 34(5):442-445.
- ✓ Matafonova G, Shirapova G, Zimmer Ch, Giffhorn F, et al. 2006. Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus* sp. Isolated from an aeration pond in the Baikalsk pulp and paper mill (Russia). *International Biodeterioration and Biodegradation.* 58:209-212
- ✓ Pandey J, Chauhan A, Jain R. 2009. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiol Rev.* 33:324-379.
- ✓ Singh S, Bahadur B, Chandra R. 2009. Biodegradation of phenol in batch culture and mixed strains of *Paenibacillus* sp and *Bacillus cereus*. *Polish J of Microbiol.* 58(4):319-325
- ✓ Lin J, Reddy M, Moorthi V, Qoma BE. 2008. Bacterial removal of toxic phenols from an industrial effluent. *African J of Biotechnol.* 7(13):2232-2238.
- ✓ Kargi F, Eker S. 2005. Kinetics of 2,4-dichlorophenol degradation by *Pseudomonas putida* in batch culture. *Int J Biodeterioration Biodegrad.* 55:25-28.

- ✓ Häggblom M, Valo R. 1995. Bioremediation of chlorophenol wastes. In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Ed Youn L, Cerniglia C. Wiley-Liss. Cap 11. Pp 389-434.
- ✓ Mattila, P; Kumpulainen, J. 2002. "Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection". *J. Agric. Food Chem.*, 50:3660-366.
- ✓ ICH. 2004. Topic Q1 A. Stability Testing Guidelines. Stability Testing of New Drug Substances and Product. N.Y. USA.
- ✓ APHA. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association/American Water Works Association/ Water Pollution Control Federation, Washington, DC.
- ✓ Norma Cubana. TS 368: 2010. "Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos".
- ✓ Botré C, Botré F, Mazzei F, Podestá E. 2009. "Inhibition-based biosensors for the detection of environmental contaminants: determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:2876-2881.
- ✓ Ferreira Guedes S. 2010. "Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida selectivo amplamente utilizado na agricultura, por uma estirpe de *Penicillium*". Tesis en opción al grado de Maestro en Tecnología y seguridad alimentaria. Universidad de São Paulo.
- ✓ Magdolna Z, Gruiz K, Molnár M, Fenyvesi E. 2013. "Comparative evaluation of microbial and chemical methods for assessing 4-chlorophenol biodegradation in soil". *Chemical Engineering*, 57(1-2):25-35.
- ✓ Al-ThaniR, Abd-El-HaleemD, Al-ShammriM. "Isolation, biochemical and molecular characterization of 2-chlorophenol degrading *Bacillus* isolates". *African J of Biotechnol.*2007, 6(23):2675-2681.
- ✓ Pérez R.M.; Abalos A.; Gómez J.M; Cantero D. 2009. Biosorption of chromium, copper, manganese and zinc by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 isolated from a site contaminated with petroleum. *Bioresource Technology* 100:1533-1538.
- ✓ Paz D. M. 2002. Biodegradación anaerobia de compuestos tóxicos en aguas residuales industriales. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Química .Universidad de Santiago de Compostela.

- ✓ Juangand R.S. S.Y. Tsai. 2006. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate. *Biochemical Engineering Journal*, 31:133–140
- ✓ Agarry S.E., A.O. Durojaiye, B.O. Solomon. 2008. Microbial degradation of phenols. *Int. Journal Environment and Pollution*, 32(1).

Páginas WEB consultadas

- ✓ <http://www.insht.es> N° CAS. 106-48-9. International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. 4 CP, ICSC: 0850, 28 de Diciembre de 2007.
- ✓ <http://www.insht.es> N° CAS 120-83-2 International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. 2.4-DCP, ICSC: 0438, 28 de Diciembre de 2007.
- ✓ <http://www.insht.es> N° CAS 95-95-4. International Chemical Safety Cards (WHO/IPCS/ILO) Fichas Internacionales de Seguridad Química. 2, 4,6-TCP, ICSC: 0879, 28 de Diciembre de 2007.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 2.1 Protocolo Estándar de McFarland

Standard	BaCl₂ 1% (mL)	H₂SO₄ 1% (mL)	Suspensión bacteriana x10⁸
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.90	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

Anexo 3.1 Análisis de Varianza Multifactorial para turbidez en el 2-clorofenol a diferentes concentraciones.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor- P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:B.CONCENTRACION	0,00072533 3	1	0,00072533 3	1,78	0,1956
B:B.TIEMPO	0,046336	10	0,0046336	11,38	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0032114	10	0,00032114	0,79	0,6398
RESIDUOS	0,00895667	22	0,00040712 1		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0607042	43			

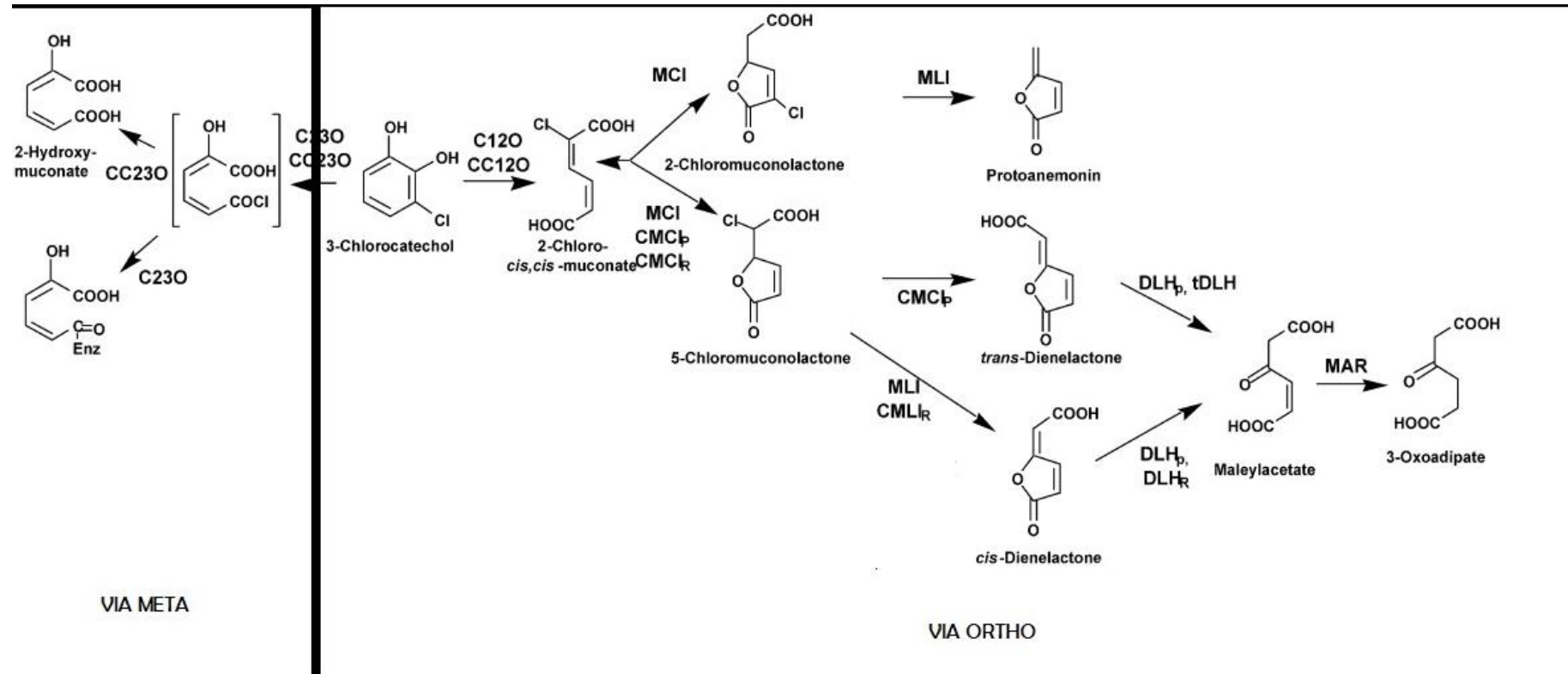
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 3.3 Análisis multifactorial de varianza para la variable cloruro para el 2-clorofenol a diferentes concentraciones.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:B.CONCENTRACION	0,0112067	1	0,0112067	15,77	0,0006
B:B.TIEMPO	0,839828	10	0,0839828	118,16	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0234589	10	0,00234589	3,30	0,0093
RESIDUOS	0,015636	22	0,000710729		
TOTAL (CORREGIDO)	1,01317	43			

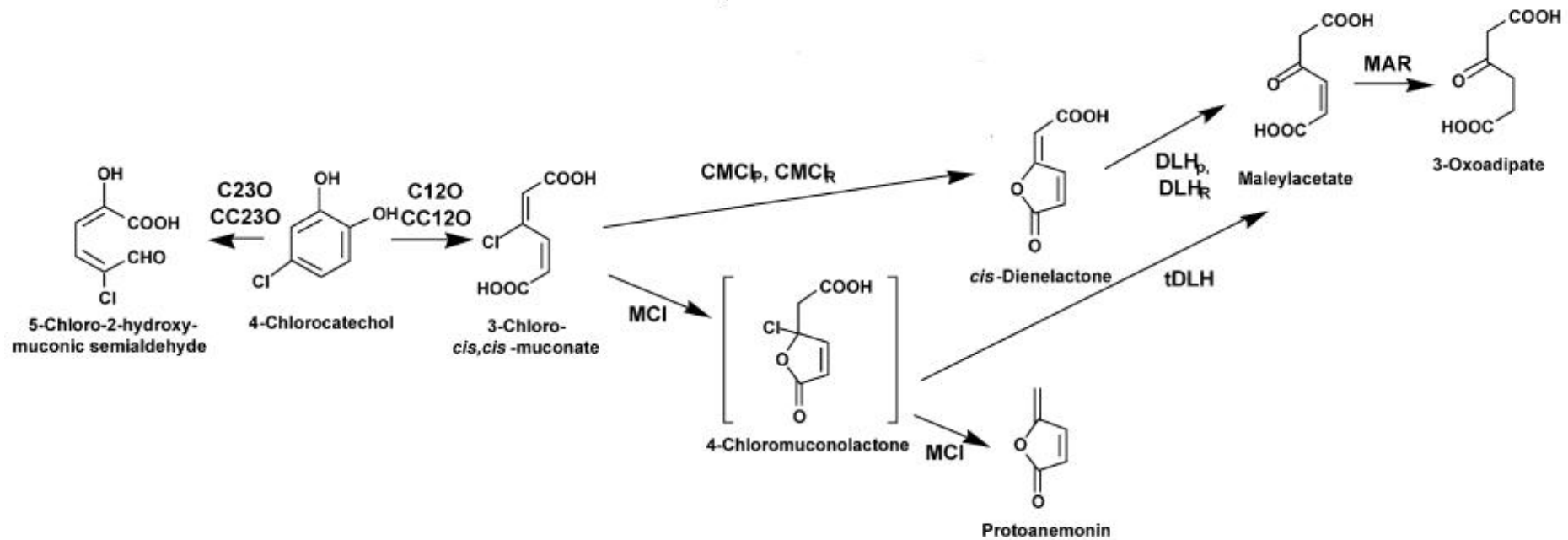
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Anexo 3.2 Vía orto y meta para degradar 2-Clorofenol



Vías de degradación del 2-clorofenol. I: fenol hidroxilasa; C23O: catecol-2,3-dioxigenasa; CC23O: clorocatecol-2,3-dioxigenasa; C12O: catecol-1,2-dioxigenasa; CC12O: clorocatecol-1,2-dioxigenasa; MCI: muconatocicloisomerasa; CMC_p: cloromuconatocicloisomerasa de protobacteria; MLI: muconolactonaisomerasa; DLH_p: dienolactona hidrolasa de protobacteria; tDLH: transdienolactona hidrolasa; MAR: maleilacetatoreductasa (Farrell and Quilty, 1999; Pieper, 2005).

Anexo 3.4 Vía orto para degradar 4-clorofenol



Vías de degradación del 4-clorofenol. I: fenol hidroxilasa; C23O: catecol-2,3-dioxigenasa; CC23O: clorocatecol-2,3-dioxigenasa; C12O: catecol-1,2-dioxigenasa; CC12O: clorocatecol-1,2-dioxigenasa; MCI: muconatocicloisomerasa; CMCIp: cloromuconatocicloisomerasa de protobacteria; MLI: muconolactonaisomerasa; DLHp: dienolactona hidrolasa de protobacteria; tDLH: transdienolactona hidrolasa; MAR: maleilacetatoredutasa (Farrell and Quilty, 1999; Pieper, 2005).