

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE FENOL
POR RESPIROMETRÍA



MELBA PATRICIA AHUMADA ARIAS
RAYZA KARLA GÓMEZ IBARRA

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA
BOGOTA.D.C
2009

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE FENOL
POR RESPIROMETRÍA

MELBA PATRICIA AHUMADA ARIAS
RAYZA KARLA GÓMEZ IBARRA

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA
BOGOTA.D.C
2009

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE FENOL
POR RESPIROMETRÍA

MELBA PATRICIA AHUMADA ARIAS
RAYZA KARLA GÓMEZ IBARRA

APROBADO

Fabio.A.Roldán, PhD
Director

Alejandro Reyes
Asesor

Gloria Acosta Peñaloza, MSc.
Microbióloga
Jurado

Jaime Casas Mateus M. Ed.
Químico farmacéutico
Jurado

EVALUACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE FENOL
POR RESPIROMETRÍA

MELBA PATRICIA AHUMADA ARIAS

RAYZA KARLA GÓMEZ IBARRA

APROBADO

Ingrid Schuler García Ph.D
Decano Académico

Janeth Arias Palacios M.Sc, M. Ed
Director Carrera Microbiología

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

DEDICATORIA

A mi Dios quién ha sido mi gran fortaleza en los momentos difíciles y me ha dado la sabiduría y discernimiento necesario en este largo camino
A mi madre, Amanda Elena por su apoyo y amor incondicional
A mi papá Carlos por creer en mí y darme la oportunidad de alcanzar este logro
A mis hermanos por ser mi soporte en los momentos de angustia
A mis amigos por sus consejos los buenos momentos que hemos compartido
A mi novio Andrés Felipe por su amor, paciencia y apoyo en los buenos y malos momentos
Y a toda mi familia por su permanente compañía
A todos ellos GRACIAS por ser mi inspiración y quienes guían mi camino.

Rayza Karla Gómez Ibarra

A Dios por ser la luz y la guía en este camino, por darme sabiduría y reglarme lo mejor de mi vida... mis padres
A ellos que siempre han creído en mí
A mi papá, que aunque ya no está, su amor y sus consejos permanecen aun conmigo
A mi mamá por ser mi heroína y por enseñarme a enfrentar las adversidades
A mi familia por confiar y respaldarme en mis decisiones
A mis amigos por tener siempre una voz de aliento y acompañarme a lo largo de este trabajo.

Melba Patricia Ahumada Arias

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento especial:

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana por su colaboración y apoyo logístico, en la realización de este proyecto.

A Fabio Roldán, por su paciencia, sabiduría, constante orientación y por contribuir a nuestra formación personal y profesional.

A Alejandro Reyes, nuestro Asesor, por su colaboración y orientación.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el apoyo de esta investigación, en especial a Erika García, Habib Yanine y nuestros compañeros de la unidad.

A Dios, y a nuestros padres por su apoyo incondicional y por poner todo su amor y confianza en nosotras.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ANEXOS	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEÓRICO	3
2.1 Fenol	3
2.1.1 Orígenes y usos del fenol	3
2.1.2 Toxicidad del fenol	5
2.1.2.1 Estudios ecotoxicológicos	6
2.1.2.2 Efectos en la salud humana	7
2.1.3 Regulación y legislación	8
2.2 Biodegradación	9

2.2.1	Factores que afectan la biodegradación	10
2.2.1.1	Temperatura	10
2.2.1.2	pH	10
2.2.1.3	Nutrientes	11
2.2.2	Degradación aeróbica	12
2.2.3	Degradación anaeróbica	15
2.2.4	Biodegradación del fenol	16
2.3	Métodos para monitorear la biodegradación	19
2.3.1	Respirometría en suelos	19
2.3.1.1	Evaluación del Consumo de oxígeno	20
2.3.1.2	Evaluación de la producción de dióxido de carbono	22
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	27
4	OBJETIVOS	29
4.1	Objetivo general	29
4.2	Objetivos específicos	29
5	MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1	Evaluación de bacterias degradadoras de fenol	30
5.2	Evaluación de la capacidad para degradar fenol	33
5.2.1	Producción del inóculo	33
5.2.2	Montaje de microcosmos	33
5.2.2.1	Preparación del suelo	33
5.2.2.2	Preparación de microcosmos	34
5.2.2.3	Controles empleados	35
5.3	Evaluación respirométrica de la biodegradación del fenol	35
5.3.1	Monitoreo del consumo de oxígeno	36

5.3.2	Monitoreo de la producción de dióxido de carbono	37
5.3.2.1	Condiciones cromatográficas	37
5.3.2.2	Preparación de estándares de la producción de dióxido de carbono	38
5.3.2.3	Medición de CO ₂ en los tratamientos evaluados	40
5.3.3	Coefficiente de respiración	40
5.4	Análisis estadístico	41
6	RESULTADOS Y DISCUSION	42
6.1	Bacterias seleccionadas por su capacidad de degradar el fenol	42
6.2	Características del suelo utilizado	45
6.3	Análisis respirométrico de la biodegradación del fenol	46
6.3.1	Análisis del consumo de O ₂ en los microcosmos	47
6.3.1.1	Tasas de consumo de O ₂	50
6.3.2	Producción de CO ₂ en los microcosmos	51
6.3.2.1	Curva patrón para la medición de la producción de CO ₂	51
6.3.2.2	Análisis de la producción de CO ₂	52
6.3.2.3	Tasas de producción de CO ₂	55
6.3.3	Coefficiente de respiración en la biodegradación del fenol	57
7	CONCLUSIONES	59
8	RECOMENDACIONES	61
9	BIBLIOGRAFÍA	62
10	ANEXOS	73

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del fenol.....	4
Tabla 2. Principales industrias productoras de compuestos fenólicos.....	5
Tabla 3. Estudios ecotoxicológicos del fenol.....	6
Tabla 4. Relación de C:N:P empleado durante los procesos de biorremediación de HC's.....	12
Tabla 5. Estudios de la degradación del fenol.....	17
Tabla 6. Estudios respirométricos de la degradación del fenol.....	24
Tabla 7. Microorganismos evaluados en la biodegradación del fenol.....	31
Tabla 8. Bacterias con capacidad de degradar fenol.....	42
Tabla 9. Tasas de consumo de O ₂ desde el día 4 al 12 en la biodegradación del Fenol.....	50
Tabla 10. Tasas de producción CO ₂ desde el día 3 al 13 en la biodegradación del Fenol.....	56
Tabla 11. Coeficiente respiratorio en los días 9 y 13 en la biodegradación del Fenol.....	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Vías metabólicas para la degradación del fenol.....	14
Figura 2. Equipo HACH utilizado para determinar el consumo de O ₂	36
Figura 3. Cromatógrafo Shimadzu GC-2014 empleado en la determinación de la producción de CO ₂ en los microcosmos.....	37
Figura 4. Fabricación de estándares para determinar la producción de CO ₂	39
Figura 5. Medición del consumo de oxígeno durante la degradación del fenol durante 13 d.....	48
Figura 6. Medición del consumo de oxígeno durante la degradación del fenol durante 13 d.....	49
Figura 7. Curva patrón de la concentración de CO ₂	51
Figura 8. Producción de CO ₂ durante la degradación del fenol, durante 13 d (primer montaje).....	54
Figura 9. Producción de CO ₂ durante la degradación del fenol durante 13 d (segundo montaje).....	55

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Medio de cultivo Bushnell-Hass
- ANEXO 2.** Cálculos para ajustar la humedad en los microcosmos
- ANEXO 3.** Cálculos para obtener una concentración de fenol de 250 mg/l
- ANEXO 4.** Cálculos para determinar la relación de C: N: P
- ANEXO 5.** Cálculos para determinar la concentración de CO₂
- ANEXO 6.** Consumo de O₂ en la biodegradación del fenol
- ANEXO 7.** Análisis estadístico del consumo de O₂ en la biodegradación del fenol
- ANEXO 8.** Producción de CO₂ en la biodegradación del fenol
- ANEXO 9.** Análisis estadístico de la producción de CO₂ en la biodegradación del fenol
- ANEXO 10.** Espectro de masas de la degradación del fenol por la cepa PUJ-M-Bio-USBA 181

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la capacidad de bacterias para degradar el fenol por medio de la respirometría, como un método en el monitoreo de la biodegradación. Se emplearon microcosmos con adición de nutrientes en forma de sales inorgánicas simples (SIS) y fenol (250 mg/Kg de suelo), en donde se evaluaron 11 bacterias y tres controles; control abiótico (CA), un control con sustancia de referencia y microorganismos degradador de dicha sustancia (diesel) (SR); y uno con microorganismo de referencia (*Acinetobacter sp.*), sin ninguna fuente de carbono (CS). Los ensayos se realizaron durante trece días bajo condiciones de laboratorio. Para monitorear la biodegradación, se evaluó la respirometría por medio del consumo de O₂ y la producción de CO₂.

El mayor consumo de O₂ y producción de CO₂ fue observado en *Stenotrophomonas* y *Acinetobacter sp* (adaptada al fenol). *S. acidaminiphila*, y *Acinetobacter sp.* mostraron las mayores tasa de consumo de O₂ (79 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹ y 77 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹), mientras *Acinetobacter sp* presentó la mayor tasa de producción de CO₂. Por otro lado, el coeficiente de respiración indicó que *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter sp.* presentaron la capacidad de mineralizar el fenol. *Acinetobacter sp.* (PUJ-M-Bio-USBA-181), presentó la mayor tasa de consumo de O₂ y producción de CO₂, y un coeficiente de respiración (CR.) que indicó que el consumo de O₂ fue atribuido a mineralización.

Palabras clave: biodegradación, consumo de O₂, fenol, producción de CO₂, respirometría

ABSTRACT

The present study evaluated the capacity of bacteria to degrade phenol by respirometry, as a method for the monitoring biodegradation. Microcosms were used with addition of nutrients, in form of simple inorganic salts (SIS), and phenol (250 mg/Kg of soil). 11 bacteria and three controls were evaluated; abiotic control (CA), reference substance (diesel) (SR), and a reference microorganism (CS) (*Acinetobacter sp.*) without any source of carbon. The experiments were conducted during thirteen days under laboratory conditions. To monitor biodegradation, the respirometry was evaluated by means of the O₂ consumption and CO₂ production. The highest O₂ consumption and CO₂ production were observed with *Stenotrophomonas sp.* and *Acinetobacte sp.*

Stenotrophomonas acidaminiphila, and *Acinetobacter sp* (previously adapted to phenol), showed the highest O₂ consumption rates (79 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹ y 77 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹), while *Acinetobacter sp.* showed the highest CO₂ production rates. On the other hand, the respiration coefficient indicated that *Acinetobacter sp.* and *Pseudomonas aeruginosa* were able to mineralize phenol. *Acinetobacter sp.* (PUJ-M-Bio-USBA-181) presented the highest O₂ consumption rate and production CO₂ and a coefficient of respiration (CR), to explain to O₂ consumption of mineralization attributed.

Keywords: biodegradation, O₂ consumption, CO₂ production, phenol, respirometry

1. INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de las industrias químicas y del sector petrolero está acompañado del aumento en la generación de residuos, los cuales pueden traer consecuencias indeseables para el ecosistema y la salud pública. Estos compuestos pueden permanecer largos períodos de tiempo y muchas veces son dispuestos de manera indiscriminada en el ambiente. Dentro de los contaminantes más comunes se encuentran los hidrocarburos (HC's), los cuales están formados por carbono e hidrógeno, con diferentes configuraciones estructurales de acuerdo al número y ubicación de sus átomos en la molécula.

El fenol es un compuesto aromático, que posee un anillo bencénico en su estructura el cual le confiere una mayor estabilidad y reactividad química. Este compuesto se genera naturalmente por procesos de humificación y degradación de proteínas, sin embargo, también se encuentra en el ambiente por actividades industriales como preparación de antisépticos, tintas, resinas sintéticas, biocidas, aceites y otros semejantes.

Es así como las descargas de fenol generadas por estas industrias son de gran interés ambiental, ya que pueden ser tóxicos para plantas, animales y humanos. Por tal razón este compuesto es reportado como un contaminante peligroso de prioridad relevante, por diferentes instituciones nacionales e internacionales como el Ministerio del Medio Ambiente y Vivienda, Instituto Colombiano y Agropecuario (ICA), la Agencia de Protección Ambiental (EPA), y el Departamento de Protección al Medio Ambiente de Estados Unidos (DEP).

Por esta razón se han buscado diferentes alternativas para el tratamiento del fenol, como la biorremediación de ambientes contaminados que representa una alternativa amigable con el medio ambiente, siendo esta una herramienta ampliamente utilizada por organismos internacionales como la EPA, para el tratamiento de este tipo de residuos, ya que resulta ser menos costosa, se aplica a áreas grandes y es

relativamente sencilla. En la biorremediación se utilizan organismos para acelerar la degradación total o parcial de los contaminantes, transformándolos en compuestos menos tóxicos o inocuos (dióxido de carbono, biomasa y agua).

A partir de lo anterior surge la necesidad de buscar e identificar microorganismos con potencial biotecnológico para remediar ambientes contaminados con fenol. Es así como este trabajo, parte de una colección de bacterias aisladas en estudios previos, realizados en la línea de biorremediación de ambientes contaminados de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA), que demostraron potencial para degradar HC's, de las cuales se seleccionaron y evaluaron bacterias con capacidad para degradar el fenol en suelos.

Este estudio tuvo como propósito seleccionar y evaluar bacterias con capacidad de degradar fenol en suelo, usando la respirometría como un método para el monitoreo de la biodegradación, ya que mediante el consumo de oxígeno (O_2) y la producción de dióxido de carbono (CO_2) permite medir la degradación de un contaminante en diferentes tratamientos, la actividad metabólica de los microorganismos del suelo y además el impacto del contaminante (fenol) sobre los microorganismos del suelo. El consumo de O_2 y la producción de CO_2 permitieron evaluar la degradación del fenol en suelos, parámetros que fueron monitoreados por un respirómetro manométrico y por un cromatógrafo de gases.

2. MARCO TEORICO

2.1 Fenol

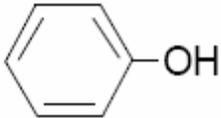
Siendo un HC aromático (en términos de biorremediación), el fenol se deriva de compuestos como el hidroperóxido de cumeno, ácido benzoico y cloro benceno (Razo, 2003). Según la nomenclatura de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), los nombres registrados del fenol son ácido carbólico, ácido fenólico o alcohol fenílico. Sin embargo, es ampliamente conocido por sus sinónimos como: hidroxibenceno, oxibenceno, bencenol, hidrato fenílico y monofenol (EPA, 2000).

Este compuesto visualmente tiene un aspecto cristalino, de color amarillo o ligeramente rosado, presenta un olor característico dulce y alquitranado (Tabla 1). La reactividad química del fenol es atribuida a su grupo fenilo, que reacciona con bases y ligeramente con algunos ácidos (IPCS, 1994; Rodríguez y Torres, 2001), con bases el fenol forma sales como los fenolatos, es sensible a agentes oxidantes generando productos como la hidroquinona, además de sufrir reacciones de sustitución electrofílica como halogenación y sulfonación (IPCS, 1994; EPA, 2000). Estas propiedades hacen que el fenol en el ambiente reaccione con otros compuestos y de esta manera su estructura sea fácilmente alterada, convirtiéndole en un compuesto más complejo y de difícil de degradación.

2.1.1 Orígenes y usos del fenol

El fenol esta presente en alimentos (frutas, vegetales y té), en el exudado de las raíces de las plantas, desechos de humanos, animales, y es producido durante la descomposición de materia orgánica y el metabolismo de las proteínas. Adicionalmente, esta presente en aceites del craking del petróleo, generado durante la producción de estos por hidrogenación de la hulla u oxidación del benceno (EPA, 2000; Rodríguez y Torres, 2001; Razo, 2003; Roy y Popelier, 2008).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del fenol

PROPIEDAD	VALOR
Peso molecular.	94.12
Formula empírica.	C ₆ H ₆ O
Estructura química.	
Punto de ebullición.	181.8°C
Punto de fusión.	43°C
Densidad, a 20°C con la densidad relativa del agua a 4°C.	1.0576 g/ml
Solubilidad en Agua, a 25°C.	87 g/l
Coefficiente de Octanol (log K _{ow})	1.46

(Tomado de IPCS, 1994; EPA, 2000; Razo, 2003; Murcia, 2007).

El fenol llega al medio ambiente como un intermediario de la degradación de compuestos aromáticos naturales como la lignina, taninos y precursores de aminoácidos, pero la mayor cantidad de descargas del fenol al ambiente son

producidas sintéticamente por diferentes industrias (Tabla 2) (EPA, 2000; Razo, 2003).

Tabla 2. Principales industrias productoras de compuestos fenólicos.

INDUSTRIA	COMPUESTOS GENERADOS
Petrolera, refinería	HCs, bencenos, toluenos, naftalenos, bifenilos , fenol , <i>n</i> -octanos, <i>n</i> -decanos, azufe y amonio.
Petroquímica	Naftaleno, heptanos, bencenos, fenol y alcoholes de 4 carbonos.
Manufactura de compuestos químicos	<i>m</i>-amino fenol , dinitrofenol , <i>p</i>-nitrofenol , trinitrofenol , analina, clorobencenos y tolueno.
Farmacéutica	Toluenos, ácidos fenil-acéticos , cloroformo, éter, alcohol etílico, fenol .
Papelería	Ligninina, vainillina, ácido feulico, ácido protocatéuico, ácido benzoico, guaicol, catecol, ácido fenil propiónico , fenoles y clorofenoles .
Fibras sintéticas	Bifenoles , benzoato, epóxidos.
Desinfectantes	Fenol , ácido benzoico.

(Tomado de Kumaran y Paruchuri, 1997).

2.1.2 Toxicidad del fenol

Se ha comprobado que el fenol es un compuesto tóxico para la salud humana, animales, plantas y el medio ambiente, debido a la concentración y la presencia de radicales libres (Roy y Popelier, 2008).

2.1.2.1 Estudios ecotoxicológicos

Por su toxicidad y reactividad el fenol puede afectar ecosistemas acuáticos o terrestres (Tabla 3), debido a que es soluble en agua y puede realizar reacciones de condensación y polimerización con un amplio número de compuestos (Kondrateva *et al.*, 2001; Scheiner y Gurevitch, 2001). Gracias a estudios ecotoxicológicos realizados en diferentes organismos, se ha generado un gran interés en el cuidado que se debe tener al manejar este compuesto (EPA, 2000; Canadian Environmental Protection ACT, 2000)

Tabla 3. Estudios ecotoxicológicos del fenol.

Organismo	Ecosistema	Letalidad	Tiempo
<i>Lactuca sativa</i>	Terrestre	CL ₅₀ = 79 mg/Kg	5 d
<i>Daphnia Magna</i>	Acuático	CL ₅₀ = 12 mg/l	24 h
<i>Eudrilus eugeniae</i>	Acuático	CL ₅₀ = 188 mg/Kg	14 d
<i>Carassius auratus</i>	Acuático	DL ₅₀ = 46 mg/l	24 h
Humanos	Terrestre	DL ₅₀ : 14-930mg de fenol/Kg de peso	24 h

CL₅₀ o DL₅₀, hacen referencia a la concentración o dosis letal individual que provoca la muerte del 50% de la población (Tomado de Neuhauser *et al.*, 1986; IPCS, 1994; EPA, 2000; Environment Canada, 2000; Rodríguez y Torres, 2001).

En ambientes acuáticos el fenol tiene efectos adversos sobre todos los niveles, en el caso de las macrófitas de agua se genera crecimiento anormal y clorosis; mientras que para organismos superiores como los peces e invertebrados son más sensibles a la exposición del fenol con efectos letales, ya que estos organismos solo pueden tolerar concentraciones hasta de 1,211mg/l (Tisler y Koncan, 1995).

Para organismos terrestres se ha reportado un incremento en la mortalidad de algunas especies como las lombrices de tierra cuando son expuestas a concentraciones de 188 a 6,900 mg/Kg de fenol (Neuhauser *et al.*, 1986; Neuhauser y Callahan, 1990). El fenol también puede causar efectos mutagénicos en células de algunos mamíferos, como en el caso del hámster donde produce mutación en fibroblastos y en células linfáticas (Tsutsui *et al.*, 1997).

2.1.2.2 Efectos en la salud humana

El hombre se encuentra constantemente expuesto al fenol, debido a que está presente en la atmósfera a donde los niveles ambientales calculados por la Organización Mundial de la Salud son de aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (IPC, 1994; Rodríguez y Torres, 2001). Es así como este compuesto representa un gran peligro para su salud, ya que es absorbido fácilmente por el cuerpo afectando a órganos como el hígado, pulmones, riñones y mucosa gastrointestinal, donde provoca diferentes patologías entre las que se encuentran la acidosis metabólica, anorexia, hiperventilación, insuficiencia renal aguda, afecciones al sistema nervioso central, el estado de coma, cáncer y muerte (EPA, 2000; Rodríguez y Torres, 2001).

Otro tipo de patologías que se presentan con gran incidencia por contacto o consumo de fenol, son las afecciones sobre el sistema respiratorio que pueden causar inflamación de la tráquea, ulceración y edema pulmonar (Ferrís *et al.*, 2003); cardiovascularmente causa hemólisis, arritmias e hipotensión (Murcia, 2007).

También estudios epidemiológicos han demostrado que el fenol puede generar disrupción endocrina, con disfunción reproductiva, la cual se evidencia en desordenes hormonales como procesos de feminización en machos y masculinización en hembras (Argemi *et al.*, 2005).

2.1.3 Regulación y legislación sobre el fenol

Como resultado de los estudios ecotoxicológicos y los efectos que puede causar a la salud humana, los organismos ambientales han centrado su atención en el seguimiento y regulación del fenol, controlando su disposición al medio ambiente debido a sus incidencias en la salud humana.

Por tal razón, el fenol es considerado un contaminante de vigilancia prioritaria para países como Estados Unidos. La EPA lo ha clasificado dentro del grupo D, como un compuesto no asociado directamente al cáncer pero si a otras patologías (EPA, 1997), y también se encuentra en el listado U (U188), donde está consignado como un residuo tóxico de vigilancia ambiental (EPA, 2005).

El fenol esta incluido dentro del sistema de información de riesgos integrales de la EPA (del ingles *Integrated Risk Information System*, IRIS), como fenol puro y 2,6 dimetil; compuestos que para su uso y comercialización deben ser notificados ante las autoridades correspondientes. Así mismo el código de registro federal (del ingles *code of federal register*, CFR), lo incluye dentro de las sustancias y mezclas químicas con consideración relevante para su comercialización o exportación, por sus efectos en la salud humana y el ambiente.

Para otros países como Hong Kong, con el Departamento de Protección Ambiental (del ingles *Environment Protection Departamento*, EPD) estableció 0.5 a 0.9 µg/l como límite permisible en alcantarillado (Kueh y Lam, 2008).

A nivel nacional, la regulación del fenol esta enfocada en el vertimiento y descargas de los residuos fenolicos al alcantarillado, mediante el decreto 1594 de 1984 del

Ministerio de Salud y Protección Social, donde se estableció un límite de descargas industriales de 0.2 mg/l.

En Colombia, las industrias con mayor vertimiento de compuestos fenólicos son: farmacéuticas, petroquímicas y textiles. El Ministerio del Medio Ambiente y Vivienda por medio del IDEAM ha regulado los niveles de concentración de compuestos fenólicos en la disposición de lodos, para pentaclorofenol un nivel máximo de 100 mg/l , para 2, 4, 5 triclorofenol de 400 mg/l y para el 2, 4, 6 triclorofenol de 2 mg/l (Ministerio del Medio Ambiente, 2002).

Sin embargo la mayor parte de la regulación esta dispuesta para el ecosistema acuático, pero el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) con el ministerio de Salud han prohibido mediante la resolución 10255 de 1993 la importación, formulación, comercialización uso y manejo de productos fenólicos en actividades agrícolas (Ministerio de Salud, 1993).

2.2 Biodegradación

La biodegradación de HC's es un proceso, en el cual los microorganismos tienen la capacidad de utilizar parcial o completamente estos compuestos, como fuente de carbono o de energía, degradándolos hasta dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O) logrando su mineralización. Este proceso se realiza por medio de enzimas y mecanismos a nivel de membrana que permite la entrada de nutrientes y depende de varios factores como las características del contaminante, su concentración, los microorganismos presentes, las condiciones geoquímicas y ambientales, entre otras (Bossert y Bartha, 1984; Alexander,1991; EPA 2003).

2.2.1 Factores que afectan la biodegradación

2.2.1.1 Temperatura

Es un factor que afecta la supervivencia, el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos (Madigan *et al.*, 2004; Atlas y Bartha, 2005), y así mismo influye en los cambios estructurales y químicos de los HC's. La biodegradación de HC's en suelos puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas, esta disminuye generalmente cuando la temperatura es menor de 20 °C, y aumenta en rangos de 30 a 40 °C (Venosa *et al.*, 2001; Ying *et al.*, 2007).

En la degradación del fenol, la temperatura a la cual se favorece la biodegradación de este compuesto por parte de los microorganismos es de 30 °C, ya que a ésta temperatura la penetración del fenol a la célula es más eficiente (Kondrateva *et al.*, 2001; Polymenakou y Stephanou, 2005).

2.2.1.2 pH

Afecta a los microorganismos y sus enzimas, influyendo tanto en la disociación como la solubilidad de diversas moléculas y en la disponibilidad de nutrientes (Atlas y Bartha, 2005). La mayoría de bacterias heterótrofas y hongos se desarrollan óptimamente a valores de pH cercanos a la neutralidad dentro de un intervalo de 6.5 - 8.5 (Hambrick *et al.*, 1980; Leahy y Colwell, 1990; Venosa *et al.*, 2001).

Para HC's aromáticos como el fenol se ha reportado que el rango de degradación óptimo se encuentra cercano a la neutralidad (6.0-8.0) (Luo *et al.*, 2005). Así lo demuestran estudios realizados por Shawabkeha y col (2007), quienes demostraron que microorganismos como *Klebsiella oxytoca* pueden degradar fenol en un amplio rango de pH de 4.0 a 8.0, con un valor óptimo de 6.8 y otros microorganismos como *Actinobacillus sp.* pueden degradar el fenol en un rango de 7.0-7.5 (Khleifat, 2007).

2.2.1.3 Nutrientes

Para el desarrollo y supervivencia de los microorganismos, se hacen necesarios para llevar a cabo procesos de biosíntesis y otras funciones celulares. Cada organismo necesita diferentes nutrientes y a menudo los requerimientos son específicos para cada género, pero en todos los casos requiere de macronutrientes (nitrógeno y fósforo) que se necesitan en grandes cantidades, mientras que otros llamados micronutrientes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , S^{2-}), se proporcionan en menores cantidades y a veces sólo en cantidades trazas (Madigan *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2004; Farhadian *et al.*, 2008).

Los nutrientes se asimilan en estados elementales (orgánicos o inorgánicos), presentes en el ambiente y por lo tanto la cantidad presente de estos y el estado de los mismos, son importantes para llevar a cabo un proceso de biodegradación (Eweis *et al.*, 1999; Piskonen *et al.*, 2002).

Comúnmente una de las estrategias más usadas en procesos de biodegradación ha sido la bioestimulación, que consiste en la adición de nutrientes a concentraciones aprovechables estequiométricamente a una relación Carbono: Nitrógeno: Fósforo (C:N:P), en donde una óptima relación N:P puede generar un aumento en el crecimiento de diferentes poblaciones microbianas y degradación de diferentes compuestos. Dependiendo de las concentraciones de C, N y P en el ambiente contaminado las relaciones de estos nutrientes pueden variar significativamente en el proceso de biorremediación (Venosa *et al.*, 2001; Piskonen *et al.*, 2002).

La relación C:N:P más utilizada en biorremediación es 100:10:1 la cual mantiene un equilibrio de nutrientes durante el metabolismo microbiano, permitiendo acelerar el proceso de biodegradación; sin embargo han sido empleadas otros tipos de concentraciones (Tabla 4).

En la degradación del fenol se reportan las relaciones de C:N:P de 100:10:2 y 100:10:1 y se utiliza generalmente cuando no se han hecho pruebas de laboratorio para encontrar las concentraciones en campo (Piskonen *et al.*, 2002; Margesin y Shinner, 1997a ,1997b ; Song y Bartha, 1990). Sin embargo, el tipo de nutriente óptimo y sus concentraciones, varían de acuerdo a las propiedades del suelo y las condiciones ambientales específicas de cada ambiente (Atlas y Bartha, 2005).

Tabla 4. Relación de C: N: P empleada durante los procesos de biorremediación de HC's.

Relación C:N:P	Referencia
100:10:1	Song y Bartha, 1990; Calabrese <i>et al.</i> , 1993; Margesin y Shinner, 1997 b; Avila, 1999; Piskonen <i>et al.</i> , 2002; Vallejo, 2004; García y Garzón, 2005; Acosta, 2008.
100:5	Margesin, <i>et al</i> , 2000; Brook <i>et al.</i> , 2001.
100:10:2	Song y Bartha, 1990; Margesin y Shinner, 1997a; Margesin <i>et al.</i> , 2000

2.2.2 Degradación aeróbica

Para degradar compuestos aromáticos existen varios mecanismos, transporte en la membrana citoplasmática, hidroxilación y escisión del anillo (por medio de transformaciones metabólicas) (Atlas y Bartha, 2002; Madigan *et al.*, 2004; Sylvia, 2005). Los aromáticos se oxidan mediante dioxigenasas a cis, cis dihidrodioles, que son inestables y se convierten espontáneamente en catecoles (Atlas y Bartha, 2005).

En la escisión del anillo aromático del fenol, existen dos mecanismos dependientes de la posición de los grupos fenilo. El primer mecanismo, es la escisión *orto* o ruta del β -

cetoadipato, la cual tiene lugar en los carbonos que tienen el grupo OH (intradiol) en la posición 1-2 en el catecol y 3-4, en el caso del ácido protocatequico. Se producen diferentes reacciones oxigenolíticas, tanto para el catecol como para el ácido protocatequico, hasta obtener un intermediario común llamado γ -cetodipatoenol-lactona, el cual es transformado a β -cetoadipato. Finalmente, este genera como productos succinato y acetyl CoA (Figura 1), que entran al ciclo de los ácidos tricarbónicos (Briganti *et al.*, 1997; Parés y Juárez, 2002; El-Sayed *et al.*, 2003; Barrios *et al.*, 2006; Ying *et al.*, 2007; Contreras *et al.*, 2008).

El segundo mecanismo es la escisión *meta*, esta ruptura se lleva a cabo en el C portador del OH y el carbono adyacente (extradiol) para el catecol, la escisión se realiza en los carbonos 2-3 y para el ácido en los carbonos 4-5 (Suarez, 1993; Ying *et al.*, 2007). En esta ruta el catecol y el ácido protocatéquico, se desarrollan independientemente y no convergen en ningún intermediario. Los productos de la escisión *meta* son el acetaldehído y el piruvato, donde el último compuesto es un precursor clave en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (Figura 1) (Parés y Juárez, 2002; Barrios *et al.*, 2006). El intermediario más frecuente en la degradación del fenol es el catecol, el cual sufre reacciones de dihidroxilación generando la apertura del anillo aromático, permitiendo de esta manera que sea degradado por alguno de los dos mecanismos mencionados anteriormente.

Existe otra ruta, la del ácido gentísico o ácido 2,5 dihidroxibenzoico, que se forma a partir de varios compuestos como flavonones, β -naptol, 3 y 4 hidroxibenzoato, salicato y disulfonato de naftaleno (Suarez, 1993). Este ácido es oxidado, generando la apertura del anillo aromático en los carbonos 1 y 2 de la molécula; en el carbono 1 se encuentra un grupo carboxilo y en el 2 el grupo OH fenólico, formando fumarilpiruvato, el cual es hidrolizado para producir finalmente fumarato y piruvato (Suarez, 1993; Parés y Juárez, 2002).

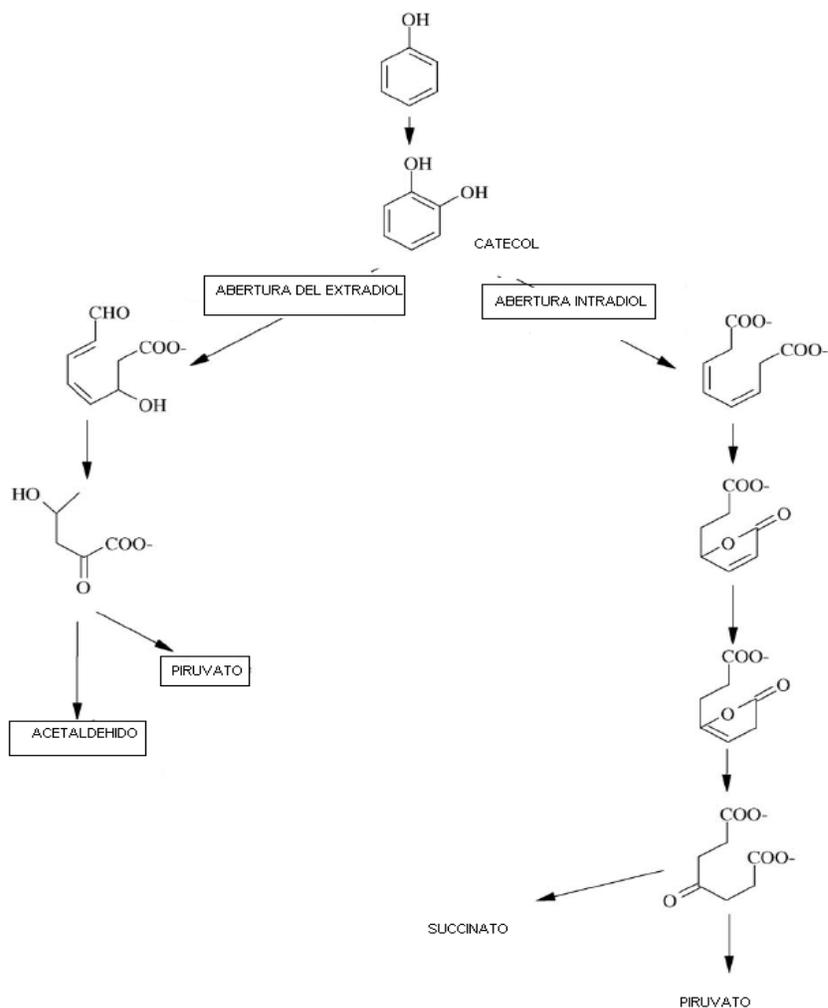


Figura 1. Vías metabólicas para la degradación del fenol. (Tomado de Barrios *et al.*, 2006).

2.2.3 Degradación anaeróbica

Es un proceso menos frecuente y más lento que el aeróbico, en donde los HC's sirven como donadores de electrones bajo distintos mecanismos como: hidroxilación, carboxilación y condensación (Alexander, 1991; Sylvia *et al.*, 2005). Los

microorganismos capaces de catalizar estas reacciones requieren aceptores de electrones diferentes al O₂, los más utilizados son el nitrato, sulfato, el ión férrico y el CO₂, entre otros.

La degradación anaeróbica se lleva a cabo en tres etapas: en la primera etapa, el sustrato debe ser activado por reacciones de carboxilación, hidroxilaciones anaeróbicas o formación de tioésteres del correspondiente ácido aromático con el acetyl-CoA; en una segunda etapa, actúan las reductasas de estos intermediarios activados, para que finalmente en la etapa tres, los compuestos sean hidrolizados (Parés y Juárez, 2002; Thomas *et al.*, 2002). La reacción general del proceso es:



(Tomado de Parés y Juárez, 2002).

Se ha demostrado que HC's aromáticos como los BTEX (benceno, tolueno, etileno y xileno) pueden ser degradados bajo condiciones anaeróbicas. Otros HC's como los PAH's (hidrocarburos aromáticos policíclicos) y algunos alcanos pueden ser degradados por bacterias sulfatoreductoras con tasas similares a las condiciones aeróbicas (Venosa *et al.*, 2001).

La biodegradación de HC's aromáticos es mucho más lenta en condiciones anaeróbicas que en presencia de O₂. Sin embargo, las tasas de biodegradación anaeróbica del tolueno y del m-xileno son suficientemente elevadas para usarla en la biorremediación de acuíferos (Atlas y Bartha, 2005).

2.2.4 Biodegradación del fenol

Este compuesto puede ser degradado en el agua o en suelo, tanto a nivel abiótico como biótico, dentro de las transformaciones abióticas del fenol, este compuesto

reacciona en el aire con radicales OH o nitrito y puede sufrir reacciones de fotólisis y reaccionar con radicales peróxido o con iones de nitrato formando dihidroxibencenos, nitrifenoles, nitrosofenol y nitroquinona (Rodríguez y Torres, 2001).

Por otro lado la degradación del fenol a nivel biótico, esta mediada principalmente por organismos capaces de utilizar este compuesto como fuente de C y energía. Las bacterias pueden llevar a cabo el proceso de biodegradación del fenol, en especial las Gram negativas, siendo el género *Pseudomonas sp.* el más reportado con esta capacidad (El-Sayed *et al.*, 2003; Koutny *et al.*, 2003; Annadurai *et al.*, 2007; Saravanan *et al.*, 2008); otros géneros de bacterias Gram negativas han sido reportados en la degradación del fenol, entre las que se encuentran *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, entre otros; no obstante las bacterias Gram positivas también tienen la capacidad de degradar este compuesto, como por ejemplo el género *Rhodococcus*. Sin embargo independientemente del tipo de bacteria, estas poseen gran actividad de monooxigenasas y dioxigenasas que permiten degradar este compuesto (Ehrt *et al.*, 1995; Heesche-Wagner, 1999; El-Sayed *et al.*, 2003; Koutny *et al.*, 2003; Bergauer *et al.*, 2005; Pradhan y Ingle, 2007). En la literatura, se reportan diferentes estudios sobre bacterias con capacidad para degradar el fenol en suelo y agua (Tabla 5).

Tabla 5. Estudios de degradación del fenol

Autores	Objetivo	Concentraciones de fenol evaluadas	Conclusiones
Tao <i>et al.</i> , 2007	<p>Evaluar la biodegradación del fenantreno por <i>Sphingomonas sp.</i> GY2B.</p> <p>Comparar la capacidad de <i>Sphingomonas sp.</i> GY2B, para degradar otros compuestos aromáticos</p>	25 , 50, 75, 100, 150 y 200 mg/l	<p><i>Sphingomonas sp.</i> GY2B, crece eficientemente a concentraciones de 100 mg/l de fenantreno, degradando más del 90% de este compuesto.</p> <p>Puede soportar concentraciones de hasta 200 mg/l de fenol</p>
Allan <i>et al.</i> , 2006	Validar la técnica de extracción con β -ciclodextra-hidroxipropil (HPCD), como una herramienta para predecir la mineralización de contaminantes orgánicos	10-100 mg/l	<p><i>Pseudomonas sp.</i> mineralizó el 70% del fenantreno en un periodo de 50 días.</p> <p>Observaron una mineralización completa del fenol, aunque está se vio afectada por la composición de los suelos y los procesos de volatilización.</p>
Shibata, <i>et al.</i> ,2005	Evaluar el destino de derivados del fenol, incluyendo alquilfenoles, en suelos agrícolas bajo condiciones aerobias y anaerobias.	30 mg de fenol/ Kg suelo	Las bacterias endógenas lograron degradar el fenol, de forma aeróbica rápidamente. De forma anaeróbica también fue degradado pero de forma mas lenta con generación de subproductos.

Tabla 5. Estudios de degradación del fenol

Autores	Objetivo	Concentraciones de fenol evaluadas	Conclusiones
Sgountzos <i>et al.</i> , 2006	Determinar experimentalmente la cinética de crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , durante la biodegradación del fenol en un biorreactor.	20, 50, 100 y 170 mg/l	<i>Pseudomonas fluorescens</i> presente las mayores tasas de degradación a una concentración de 100mg/l de fenol
Luo <i>et al.</i> , 2005	Investigar la eficacia de usar un proceso no uniforme de electrocinética, en el aumento de la biorremediación in situ, de suelos contaminados con contaminantes orgánicos.	200 mg/l	Al ionizar el fenol este es absorbido más fácilmente por los microorganismos. Se evidencia un 80 % de la degradación del fenol en los primeros días (3-10), por bacterias aisladas de suelos contaminados con petroquímicos
Pradhan e Ingle, 2007	Identificar y aislar a <i>Serratia plymuthica</i> de lodos y efluentes industriales, con capacidad de degradar fenol y otros compuestos aromáticos.	100-1100 mg/l	<i>Serratia plymuthica</i> fue capaz de degradar completamente el fenol a una concentración de 1050mg/ l alrededor de los 11 días.

2.3 Métodos para monitorear la biodegradación

Cuando se monitorea la degradación de un compuesto se debe tener en cuenta el objetivo del estudio realizado, el tiempo con el que se cuenta, las variables a medir, el acceso y el impacto que se puede generar sobre el ecosistema. Es así que se han generado metodologías que puedan evaluar el proceso de biodegradación de una sustancia; así, existen las metodologías directas, que cuantifican la reducción del contaminante en masa, volumen o concentración, realizando balance de nutrientes y utilizando técnicas cromatográficas y espectrofotométricas, entre otras (Margesin *et al.*, 2000). Las mediciones indirectas, son aquellas que evalúan la transformación o conversión de los contaminantes por el metabolismo de los microorganismos. Dentro de este monitoreo se encuentran el consumo de aceptores de electrones, la respirometría, biomasa, actividad enzimática y cambio en el pH, etc. (Gernaey *et al.*, 2001; Tzoris *et al.*, 2002; García y Garzón, 2005).

2.3.1 Respirometría en suelos

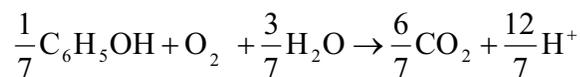
Es la medición e interpretación de la actividad respiratoria que permite evaluar indirectamente la degradación de una sustancia, en donde se evalúa el consumo de O₂ y la producción de CO₂ (Gernaey *et al.*, 2001). En estudios de suelo, la respirometría es uno de los métodos más usuales para evaluar la actividad microbiana, ya que permite inferir sobre el metabolismo activo de los microorganismos sobre el contaminante (Crittter *et al.*, 2004). Diversos estudios reportan el uso de la respirometría en procesos de biorremediación destacando la rapidez, lo fácil del montaje, la evaluación de diferentes tratamientos antes de su aplicación en campo y además se puede determinar el impacto de un contaminante sobre los microorganismos del suelo (Gernaey *et al.*, 2001; Orupold *et al.*, 2001; Crittter *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Kijchavengkul *et al.*, 2006).

2.3.1.1 Evaluación del consumo de oxígeno

Cuando las moléculas donan electrones (DE, se oxidan), necesitan de otras moléculas que a la vez acepten electrones (AE, se reduzcan), para obtener la energía necesaria en el desarrollo celular (ATP). Durante el proceso de oxidación de los HC's, los microorganismos pueden utilizar AE como el oxígeno (O₂), nitrato (NO₃⁻), hierro (Fe), y sulfato (SO₄) (Eweis *et al.*, 1999). El O₂ es el AE más utilizado por los microorganismos, ya que proporciona mayor rendimiento en la síntesis de ATP, gracias a la liberación de hidrogeniones generados por la transferencia de electrones que a su vez generan un gradiente electroquímico (Eweis *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 2000).

Muchos HC's aromáticos, pueden ser utilizados aeróbicamente como DE por los microorganismos. Durante la degradación del fenol el proceso más frecuente es la respiración aerobia, algunas bacterias del género *Pseudomonas*, han demostrado que pueden degradar el fenol de forma aerobia en un rango de 94.11- 470 mg/l (El-Sayed *et al.*, 2003). Sin embargo se han utilizado otros AE (NO₃⁻, SO₄²⁻, Mn⁴⁺ y Fe⁺³) que pueden verse involucrados en la degradación anaerobia de este compuesto y se evidencian dentro de procesos de desnitrificación y reducción de sulfato (Mayer *et al.*, 2001; Farhadian *et al.*, 2008).

En la oxidación del fenol, se utiliza el O₂ como AE, y el modelo estequiométrico teórico, que muestra como a medida que se va degradando el fenol se consume el O₂ y se produce el CO₂.



Estequiometría para la oxidación del fenol (Tomado de Mayer *et al.*, 2001)

Es así como los microorganismos necesitan moléculas de O₂ como AE en la oxidación de HC's como el fenol, que también son utilizadas en la activación de las

dioxigenasas que rompen metabólicamente este compuesto (Kapley *et al.*, 2001); por eso la medición de este parámetro proporcionan el cómo y qué tan eficiente es la biodegradación en estudios de biorremediación.

En las curvas de consumo de O₂ se presentan varias fases; la primera fase es un periodo de adaptación en donde la degradación del contaminante es escasa o nula; luego una exponencial de consumo de O₂ y la producción de biomasa, como resultado de la degradación del contaminante; y finalmente una fase estacionaria en donde la concentración de sustrato y nutrientes es escasa provocando una disminución del consumo de O₂ y el crecimiento microbiano (Fiúza y Vila, 2005; Tremier *et al.*, 2005). Lo anterior junto con la cuantificación del O₂ acumulado, que se emplea sobre los procesos de cada fase y el cálculo estequiométrico entre el consumo de O₂ y la producción del CO₂, pueden fijar un análisis químico de la concentración del contaminante a través del tiempo relacionado con la evolución de la biomasa (Fiúza y Vila, 2005).

El modelo matemático utilizado para la descripción del consumo de O₂ o la tasa respiratoria, en los procesos de biodegradación son las regresiones lineales (Reuschenbach *et al.*, 2003), en donde se determina la pendiente de la ecuación de la recta, que corresponde a la tasa respiratoria en la fase exponencial (Orupold *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004; Vahaoja *et al.*, 2006; Taok *et al.*, 2007).

Para evaluar el consumo de O₂ existe diferentes equipos llamados respirómetros, que determinan los cambios que se generan por el consumo del O₂ utilizando diferentes sistemas: eléctricos, manométricos o electroquímicos (Reuschenbach *et al.*, 2003). Dentro del grupo de respirómetros manométricos, están aquellos que cuantifican el consumo de O₂ por medio de sistemas acoplados a columnas de mercurio que evidencian los cambios de presión generados por la demanda de O₂. En estos sistemas, el CO₂ producido durante la biodegradación del compuesto, es removido por un agente alcalino (p. e., hidróxidos de sodio, potasio, litio o bario), para evitar su presencia de forma libre en el sistema. Estos respirómetros se caracterizan por su fácil

operación y la medición de altas tasas de consumo de O₂, sin embargo presentan como desventaja, limitación en la disponibilidad del O₂ (Gernaey *et al.*, 2001; García y Garzón, 2005).

Los estudios reportados en la literatura, afirman que el monitoreo del consumo de O₂ es un buen parámetro para medir la degradación de compuestos fenólicos. Kapley y col (2001) concluyeron que la concentración de O₂ puede afectar el metabolismo de las bacterias degradadoras de fenol, ya que en procesos aerobios la presencia del O₂ como AE es crucial para la supervivencia y el desarrollo microbiano, de igual forma en la degradación del fenol están involucradas una gran variedad de oxigenasas que son requeridas para metabolizar este compuesto.

2.3.1.2 Evaluación de la producción de dióxido de carbono

Otro parámetro relacionado con los procesos de respiración y que sirve para evaluar la degradación efectiva por parte de los microorganismos, es la producción de CO₂, el cual se genera como subproducto de la oxidación de los HC's (Gernaey *et al.*, 2001; Critter *et al.*, 2004). De igual forma, en las guías recomendadas para la evaluación de biodegradación de compuestos químicos por parte de la Organización de Economía para la Cooperación y Desarrollo (OECD), afirman que la medición de la producción de CO₂ es considerada como uno de los parámetros más efectivos y confiables para evaluar la actividad microbiana. En la guía 310 de la OECD se encuentran diferentes técnicas directas e indirectas, para la medición del CO₂, (p.e., titulación, cromatografía) y además relaciona a la ISO 14593, en donde se demuestra que la medición de CO₂ es una herramienta útil para monitorear procesos de biodegradación.

En la literatura se encuentran citados diversos trabajos en donde se realizan mediciones de CO₂, como los reportados por Oh y col (2000), en arena contaminada con aceite, donde se midió la concentración de CO₂ presente en los microcosmos y se obtuvieron tasas de degradación de 50 g de aceite/ Kg de suelo. Así mismo el estudio

realizado en USBA por Acosta (2008), que evaluó la medición del CO₂ en diferentes tratamientos por cromatografía de gases en cortos periodos de tiempo, lo cual demostró ser una técnica fácil y precisa. Adicionalmente estudios respirométricos en suelos contaminados con fenol y compuestos derivados, han utilizado cromatografía para la medición del CO₂ (Tabla 6).

Por otro lado existen otras técnicas para cuantificar este compuesto, como la titulación ácido base, donde un agente alcalino como el hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de bario (Ba (OH)₂) o hidróxido de litio LiOH retienen el CO₂ formado por la actividad microbiana, y es cuantificado por titulación con ácido clorhídrico y fenolftaleína como indicador (Margesin *et al.*, 2000; Kijchavengkul *et al.*, 2006). En este método el exceso de hidróxido que no reacciona es determinado por la diferencia con la producción de CO₂ (Crittter *et al.*, 2004), pese a que esta técnica es comúnmente usada, es dispendiosa y poco precisa, por lo cual actualmente se prefiere utilizar técnicas más directas como la cromatografía de gases, que además permite hacer especiación molecular (Oh *et al.*, 2000).

La cromatografía, es un método fisicoquímico de separación, donde la muestra se desplaza por una fase móvil que puede ser gaseosa, líquida o fluido supercrítico, encargada de mover la muestra a través de la columna. Esta fase móvil pasa a través de una fase estacionaria la cual es inmisible, y se queda fija a una columna o a una superficie sólida (Skoog *et al.*, 2001).

Entre los métodos generales de la cromatografía se encuentran la cromatografía de líquidos (CL), de gases (CG) y de fluidos supercríticos (CSF). En la CG, el analito (p.e., el CO₂), son sustancias orgánicas volátiles de pesos moleculares no muy altos y no termolábiles. Se diferencia principalmente de otros métodos cromatográficos en que es destructiva con la muestra y además la fase móvil no interacciona con la misma, ya que su única función es transportarla por la columna, es así que el único parámetro de separación es la fase estacionaria (Delgado y Brunetto, 2000; Skoog *et al.*, 2001; Clavijo y Brunetto., 2006; Reyes, 2008).

Tabla 6. Estudios respirométricos de la degradación del fenol

Autor	Objetivos	Metodología	Parámetros evaluados
Albertario <i>et al.</i> , 2007	Analizar la degradación biológica del fenol utilizando barros activados aclimatados y no aclimatados a dicho sustrato. Determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos correspondientes utilizando medidas respirométricas	Respirómetro abierto y cerrado, medidor de oxígeno disuelto YSI Modelo 58 , reactores semicontinuos 2.5 l, espectrofotómetro HACH	Degradación del contaminante, biomasa, concentración del fenol, efecto del contaminante sobre la respiración, velocidad de respiración endógena y exógena, concentración de oxígeno disuelto
Allan <i>et al.</i> , 2006	Evaluar la técnica de extracción hidroxipropil-b-ciclodextrina (HPCD), para determinar la fracción degradable de HC's mono y policíclicos aromáticos en 4 suelos diferentes	Respirómetro, contador de centelleo líquido (LSC) Canberra Packard Tri - Carbohidratos 2900TR	Producción de CO ₂ y degradación del contaminante.
Buitron <i>et al.</i> , 2007	Evaluar el uso de la estrategia control de tiempo óptimo dirigido por eventos (ED-TOC), en la degradación de aguas residuales municipales contaminadas con altas concentraciones de fenol.	Reactor discontinuo secuencial (SBR) aerobio, medición del oxígeno disuelto por la estrategia óptima de control, descrita por Moreno-Andrade y <i>col</i> (2006)	Oxígeno disuelto y disminución del contaminante

Tabla 6. Estudios respirométricos de la degradación del fenol, continuación.

Autor	Objetivos	Metodología	Parámetros a evaluar
Gajnar y Zagorc, 2003	Comparar la biodegradabilidad del fenol y el dietilen-glicol por 4 pruebas diferentes	Respirómetro Micro Oxymax por cambio de presión, botellas de DBO cerradas	Consumo de oxígeno, degradación de la sustancia, adición de nutrientes y demanda química de oxígeno
Lors y Mossmann, 2004	Demostrar la biodegradación intrínseca en el suelo de una refinería	pH metro Consort C833, respirómetro BI-16 (Bioscience, Bethlehem, USA), HPLC	Disminución del contaminante, pH, consumo de oxígeno y producción de CO ₂
Polymenakou et al., 2005	Determinar la biodegradabilidad del fenol por parte de <i>Pseudomonas</i> sp e identificar el producto crítico del metabolismo por cromatografía de gases.	Espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 401 UV-Vis, Cromatografo Liquido (HPLC)Hewlett Packard 1100, Cromatografo de Gases Hewlett Packard Modelo 5890 acoplado a detector de masa Hewlett Packard HP-5 MS.	Productos críticos del metabolismo, efecto de la temperatura, biomasa, disminución del contaminante

Autor	Objetivos	Metodología	Parámetros a evaluar
Reuschenbach <i>et al.</i> ,2003	Comparación de 2 sistemas (Sapromats, y Oxitops) basados en las pruebas de degradación de la OECD 301.	Analizador de carbono Shimadzu 5000, respirómetro sistema Sapromat y Oxitop, cromatografía de iones sistema dionex dx 300	Degradación del contaminante, carbono orgánico disuelto, demanda biológica de oxígeno, producción de CO ₂
Shibata <i>et al.</i> ,2006	Evaluar el destino de la biodegradación del fenol y sus derivados incluyendo alquilfenoles en varios suelos de arroz dentro de condiciones aerobias y anaerobias	Botellas de vidrio, cromatógrafo de gases Shimadzu (CG-17 A) equipado con un detector de masas (Shimadzu MS QP-5050)	Disminución del contaminante, degradación aerobia y anaerobia, efecto de las propiedades del suelo en la disminución del contaminante.
Tao <i>et al.</i> , 2007	Evaluar la capacidad para degradar fenantreno y otros compuestos aromáticos, por parte de <i>Sphingomonas sp.</i> GY2B aislada de suelos contaminados con PAH's, identificar posibles productos intermedarios de la degradación	Espectrofotometro Milton Roy Spectronic 401 UV-Vis, cromatografo liquido (HPLC) Hewlett Packard 1100, cromatografo de gases Hewlett Packard modelo 5890 acoplado a detector de masa Hewlett Packard HP-5 MS	Degradación del contaminante, identificación de productos intermedarios, crecimiento en sustratos alternativos, efectos del pH y temperatura en la degradación del contaminante

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, uno de los mayores problemas ambientales es la presencia de compuestos tóxicos originados por las actividades industriales, que afectan ecosistemas terrestres y acuáticos. Un grupo de estos contaminantes son los compuestos fenólicos, que se caracterizan por su fácil movilidad, reactividad y toxicidad (Rodríguez y Torres, 2001; Kondrateva *et al.*, 2001; EPA, 2000).

En Colombia, las industrias que generan la mayor cantidad de desechos fenólicos son las petroquímicas, de plásticos, sustancias químicas, textiles, papeleras y de tintes. Las descargas por parte de estas empresas generan un riesgo, ya que pueden contaminar los suelos y cuerpos de agua por la inadecuada disposición de estos residuos.

El impacto ambiental, que genera el fenol ha llevado a la realización de diferentes estudios que buscan dar una solución a esta problemática. Sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados en Colombia, como los de Chitiva y Dussán (2003), están enfocados únicamente al tratamiento de ambientes acuáticos dejando a un lado los ambientes terrestres. Es así, como surge la necesidad de generar estudios que utilicen soluciones biológicas, como la biorremediación para tratar suelos contaminados con fenol.

La biorremediación trata ambientes contaminados con este tipo de compuestos de una manera controlada y eficiente, ya que utiliza los microorganismos para degradar el contaminante y además es aplicable a cualquier ecosistema (terrestre y acuático).

Teniendo en cuenta el impacto ambiental, los efectos tóxicos, los pocos estudios realizados en Colombia sobre el tratamiento del fenol en suelos, y la necesidad de implementar estrategias ambientales amigables, surge la necesidad de identificar microorganismos para explotar su potencial biotecnológico y explorar su uso en

ambientes contaminados. Por estas razones, el presente estudio es uno de los primeros trabajos realizados en el país, que evalúa bacterias con capacidad de degradar el fenol en suelo, para que en un futuro puedan emplearse en tratamientos de biorremediación que mitiguen los daños causados por el fenol.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Seleccionar y evaluar bacterias con capacidad para degradar el fenol en suelos contaminados, por respirometría.

4.2 Objetivos específicos

- Seleccionar bacterias con capacidad para degradar fenol, aisladas de estudios previos de degradación de HC's en la línea de investigación de biorremediación de ambientes contaminados de USBA.
- Evaluar por respirometría (consumo de O₂ y producción de CO₂), la degradación del fenol de las bacterias seleccionadas.
- Seleccionar las bacterias con mayores tasas de degradación del fenol por respirometría.
- Comparar las tasas de consumo de O₂ y producción de CO₂, en las bacterias seleccionadas y evaluar la respirometría como un parámetro para monitorear la biodegradación del fenol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La selección de bacterias, se realizó a partir de la colección de bacterias degradadoras de HC's, aisladas en diferentes proyectos que se han realizado en la línea de investigación de biorremediación de ambientes contaminados en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA). La capacidad degradadora se evaluó en microcosmos empleando respirometría, determinando el consumo de O₂ y la producción de CO₂

Para la medición de O₂ se utilizó un respirómetro manométrico HACH[®] (Modelo 2173b), realizando lecturas diarias, mientras que para la producción de CO₂ se utilizó cromatografía de gases (Shimadzu ; GC-2014), con mediciones los días 0, 3, 6, 9 y 13, del estudio.

5.1 Evaluación de bacterias degradadoras de fenol

Fueron seleccionadas bacterias con capacidad para degradar el fenol, a las cuales se le hubiera comprobado la capacidad de degradar HC's en laboratorio (Tabla 7). Las bacterias evaluadas, se encuentran conservadas a -80°C en Skim Milk, y depositadas en la colección de microorganismos del Departamento de Biología de la Pontificia Universidad Javeriana. Con el propósito de recuperar y verificar la pureza de las bacterias a evaluar, se realizó una siembra en agar nutritivo y una tinción de Gram para descartar cualquier tipo de contaminación. Una vez verificada la pureza, se realizó el tamizaje y evaluación, inoculando los microorganismos en 10 ml de medio mínimo de sales Bushell-Hass (BH) (Anexo 1), suplementado con 500 mg/l de fenol (Merck: Reactivo) como fuente de carbono y energía. Se eligió una concentración alta con el fin de asegurar que las bacterias que resistieran, fueran promisorias degradadoras de fenol (Koutny *et al.*, 2003; Rondón y Salamanca, 2007).

Tabla 7. Microorganismos evaluados en la biodegradación del fenol.

Código Cepario USBA	Microorganismo	Método de Identificación	Origen del lugar de estudio
PUJ-M-Bio-USBA-88	<i>Orchrobacterium intermedium</i>	16s ADN	Arauca
89	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16s ADN	Arauca
90	<i>Acinetobacter baumannil</i>	16s ADN	Arauca
91	<i>Acinetobacter baumannil</i>	16s ADN	Arauca
92	<i>Acinetobacter baumannil</i>	16s ADN	Arauca
94	<i>Pseudomonas beteli</i>	16s ADN	Arauca
95	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16s ADN	Arauca
96	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16s ADN	Arauca
98	<i>Acinetobacter sp.</i>	16s ADN	Arauca
99	<i>Acinetobacter sp.</i>	16s ADN	Arauca
100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16s ADN	Arauca
101	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16s ADN	Arauca
102	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	16s ADN	Arauca
102	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	16s ADN	Arauca
104	<i>Microbacterium baskeri</i>	16s ADN	Arauca
105	<i>Arthrobacter sp.</i>	16s ADN	Arauca
106	<i>Microbacterium arborescens</i>	16s ADN	Arauca
108	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027</i>	SD	Donación
109	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	Crystal	Zipacquirá
110	<i>Stenotrophomonas monophila</i>	Crystal	Zipacquirá
111	<i>Pseudomonas putida</i>	Crystal	Zipacquirá
112	<i>Stenotrophomonas</i>	Crystal	Zipacquirá
113	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Crystal	Zipacquirá
114	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Crystal	Zipacquirá
115	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	Crystal	Zipacquirá
116	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Crystal	Zipacquirá
117	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Crystal	Zipacquirá
118	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Crystal	Zipacquirá
119	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Crystal	Zipacquirá
120	<i>Stenotrophomonas monophila</i>	Crystal	Zipacquirá

Tabla 7. Microorganismos evaluados (continuación)

Código Cepario PUJ-M-Bio- USBA-	Microorganismo	Método de Identificación	Origen del lugar de estudio
122	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crystal	Sabana de Bogotá
123	<i>Pseudomonas putida</i>	Crystal	Sabana de Bogotá
154	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	Crystal	Sabana de Bogotá
155	<i>Stenotrophomonas monophila</i>	Crystal	Sabana de Bogotá
156	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Crystal	Sabana de Bogotá
170	SD	SD	Arauca
171	SD	SD	Arauca
175	SD	SD	Arauca
176	SD	SD	Arauca
177	SD	SD	Arauca
178	<i>Shigella sp.</i>	SD	INAS
179	<i>Escherichi coli</i>	SD	INAS
180	SD	SD	Arauca
181	SD	SD	Arauca
183	SD	SD	Arauca
184	SD	SD	Arauca
185	SD	SD	Arauca
186	SD	SD	Arauca
187	SD	SD	Arauca
188	SD	SD	Arauca
189	SD	SD	Arauca
190	SD	SD	Arauca

SD: Sin determinar

Las bacterias en el medio suplementado con fenol fueron incubadas por 7d a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, en condiciones aerobias. Se realizaron 3 pases consecutivos de las bacterias en medio líquido mínimo de sales BH con adición de fenol, seleccionando los tubos con turbidez, que indicaba crecimiento bajo dichas condiciones (Luo *et al.*, 2005). Cada bacteria a evaluar, se cultivó por duplicado para aumentar la concentración celular.

5.2 Evaluación de la capacidad para degradar el fenol

5.2.1 Producción del inóculo

Una vez se realizaron los 3 pases de las bacterias en el medio suplementado con fenol, se procedió a recuperar la mayor cantidad de células para preparar el inóculo bacteriano. Los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm x 5 min (Kapley *et al.*, 2001) y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se colocó el segundo cultivo en este tubo repitiendo la centrifugación para obtener una mayor concentración celular.

5.2.2 Montaje de microcosmos

5.2.2.1 Preparación del suelo

La evaluación de la capacidad degradadora del fenol por respirometría se realizó en microcosmos, con ~85 g de suelo proveniente de un bosque de la finca La Selva, ubicado en el Departamento de Risaralda. Este lugar hace parte del área de estudio del centro de Investigaciones y Estudios en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG), específicamente del proyecto de valoración de los Bienes y Servicios Ambientales de la Biodiversidad para el Desarrollo Sostenible de Paisajes Rurales Colombianos: Complejo Ecorregional de los Andes del Norte (CEAN).

El suelo fue tamizado, con el fin de generar una matriz más homogénea para la evaluación (Ellis, 2004) y posteriormente fue esterilizado en autoclave por 1 h, a 121°C con 15 lb de presión (Trevors, 1996; Inglis *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1999). Este procedimiento se realizó durante 3d consecutivos, para destruir microorganismos y formas de resistencia bacteriana como las esporas, con el fin que las bacterias a evaluar no tuvieran alguna competencia con la microbiota del suelo utilizado (Shaw *et al.*, 1999; Luo, *et al.*, 2005).

Para determinar la eficiencia de la esterilización del suelo, se utilizó la técnica de recuento en placa para microorganismos heterótrofos (La Torre, 2007), en el que se

tomaron 5 g de suelo y se diluyeron en 45 ml de solución salina al 85 % (p/v), obteniendo una dilución 10^{-1} . La mezcla fue agitada durante 15 min a 160 rpm en una plataforma de agitación orbital para lograr el desprendimiento de los microorganismos de la matriz del suelo (Vallejo, 2004).

A partir de la dilución 10^{-1} , se realizó una siembra en superficie en agar R2A por duplicado, las cuales fueron incubadas durante 5 días a temperatura ambiente (20-25°C), para cuantificar el número de unidades formadoras de Colonia (UFC) de heterótrofas presentes en el suelo (La Torre, 2007).

El contenido de agua en el suelo fue ajustado al 60% (p/p) de humedad, con agua desionizada estéril (Shaw *et al.*, 1999). Para ajustar la humedad del suelo, este parámetro fue determinado por peso seco, ya que es determinante en los procesos de remediación (Vallejo, 2004). Para hacer esta determinación se colocaron ~10.0 g de suelo en bandejas de aluminio previamente pesadas. Posteriormente, estas fueron secadas en un horno a 105°C durante 24 h y luego las bandejas con el suelo fueron nuevamente pesadas para la determinación del peso seco (Anexo 2) (IGAC, 1979; IGAC, 1995)

5.2.2.2 Preparación de los microcosmos

Para el montaje de cada microcosmos se utilizaron botellas de vidrio ambar (500 ml), las cuales fueron lavadas con ácido sulfúrico al 5% (v/v) para eliminar residuos de jabón y materia orgánica. Se colocaron ~85 g de suelo en cada uno de los microcosmos, esta cantidad ha sido empleada en estudios de respirometría anteriormente realizados en USBA (García y Garzón, 2005; Acosta, 2008), y se añadieron 21.25 mg de fenol/ 85 x 10^{-3} Kg para una concentración final de 250 mg de fenol/Kg de suelo (Anexo 3) (Luo, *et al.*, 2005; Tao, *et al.*, 2007).

La mezcla (suelo-fenol) fue homogenizada en bandejas de aluminio desechables y colocadas en los microcosmos, los cuales fueron sellados con tapones de caucho y agrafes de aluminio (Acosta, 2008).

5.2.2.3 Controles empleados

a) Suelo estéril con diesel, como sustancia referencia (SR) a una concentración de ~20,000 mg/Kg_{ps} (Rondón y Salamanca, 2007; García y Garzón, 2005; Acosta, 2008); y *Acinetobacter sp* que ha sido identificada en estudios previos como degradadora de este compuesto por Acosta (2008). El diesel utilizado fue previamente filtrado en un filtro de 0.22 µm. Este control permitió evaluar el buen funcionamiento del montaje de los microcosmos para el consumo de O₂ y la producción de CO₂. El diesel fue seleccionado por su fácil biodegradabilidad y *Acinetobacter sp*. por la capacidad degradadora que tiene sobre este compuesto, caracterizada en estudios previos realizados en USBA sobre respirometría y degradación de hidrocarburos por la técnica del NMP (Maldonado, 2004; Vallejo 2004; Acosta 2008).

b) Un control abiótico (CA), el cual contenía suelo estéril contaminado con fenol sin ningún microorganismo, con el fin de evaluar la degradación del fenol mediante procesos abióticos (físicos y químicos) (Margensin *et al.*, 2000; Margesin y Schinner, 2001; García y Garzón, 2005; Acosta, 2008).

c) Suelo y el microorganismo de referencia (*Acinetobacter sp.*) sin ninguna fuente de carbono (CS), para evaluar la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos en el suelo, que puedan contribuir al consumo de O₂ y la producción de CO₂.

5.3 Evaluación respirométrica de la biodegradación del fenol

La evaluación de las bacterias fue realizada en suelo contaminado con fenol a una concentración de 250 mg fenol/Kg de suelo (Luo *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2007), una

solución de SIS conservando la relación C:N:P 100:10:1 (Vallejo, 2004; García y Garzón, 2005; ; Acosta, 2008), utilizando 6.1 mg de nitrato de amonio (NH_4NO_3) (Merck: grado reactivo), como fuente de nitrógeno para lograr una concentración de 25 mg N/ Kg de suelo y 1.2 mg de fosfato ácido dipotásico (K_2HPO_4) (T. J Baker: grado reactivo), como fuente de fósforo para una concentración de 2.5 mg P/ Kg de suelo (Anexo 4), y el pellet de los microorganismos seleccionados inicialmente por su capacidad para degradar el fenol (numeral 5.2.1). Las bacterias seleccionadas por utilizar el fenol como única fuente de carbón y los controles, fueron evaluados respirométricamente para el consumo de O_2 (n= 3), y la producción de CO_2 (n= 4).

5.3.1 Monitoreo del consumo de oxígeno

Se evaluó el consumo de O_2 de los microcosmos utilizando un respirómetro manométrico (HACH[®]) (Figura 2). Esta técnica ha sido utilizada en previos estudios realizados en USBA por García y Garzón (2005) y Acosta (2008), y permite medir los cambios generados en la presión por el consumo de O_2 , a través de una columna de mercurio.



Figura 2. Equipo HACH utilizado para determinar el consumo de O_2

A cada microcosmos se le colocó una trampa de hidróxido de litio (LiOH), para remover el CO₂ producido durante la biodegradación, ya que así se asegura que los cambios generados en el interior de los microcosmos son producidos por el consumo de O₂ (Gernaey *et al.*, 2001).

5.3.2 Monitoreo de la producción de dióxido de carbono

5.3.2.1 Condiciones cromatográficas

Para evaluar la producción de CO₂ se utilizó un cromatógrafo de gases, equipado con una columna capilar RT-QPLOT de 30m de largo por 0.53mm de diámetro interno, y un detector de conductividad térmica (TCD) (Figura 3). El helio, de pureza grado 5.0 fue usado como gas de arrastre (flujo total de 204.8 mm/min) a un split de 10:1 para el primer montaje y 40:1, para el segundo montaje, dos splits por ajustes técnicos del cromatógrafo. Es de anotar que se emplearon los mismos valores de split, tanto para patrones como para muestras en cada montaje.

Por el número de tratamientos y el tiempo necesario para el análisis de cada muestra fue necesario realizar 2 montajes en el tiempo. Durante el primer montaje se evaluaron 6 microorganismos mientras que durante el segundo se evaluaron 5. Para los dos montajes se evaluaron los controles (BA, CA, CS).



Figura 3. Cromatógrafo Shimadzu GC-2014 empleado en la determinación de la producción de CO₂ en los microcosmos.

Las muestras se inyectaron manualmente, tomando 50 µl del espacio de cabeza (EC) de los microcosmos, con una jeringa Hamilton de 100 µl, las cuales se homogenizaron reinyectando 5 veces la muestra (Acosta, 2008). La temperatura del inyector y el detector fueron mantenidas a 65 y 200°C, respectivamente. Se utilizó una rampa de temperatura para la corrida de lectura, en donde la columna inició con 60 °C por 6 min, luego fue llevada a 30°C por min hasta llegar a 100 °C donde permaneció isotérmico por medio min.

El espacio de cabeza (EC), de los microcosmos se calculó el CO₂ producido durante la degradación utilizando la metodología descrita por Acosta, 2008. Se pesaron microcosmos con ~ 85 g de suelo (n=3), se les adicionó agua destilada y se volvieron a pesar. Matemáticamente el EC se determinó con la siguiente (Ecuación 1):

$$EC(g) = (\text{Peso microcosmo} + \text{Agua}) - (\text{Peso microcosmo})$$

Ecuación 1

El resultado obtenido de la anterior ecuación esta dado en gramos, para convertirlo en unidades de volumen (l), se corrigió con la densidad del agua a 20°C (0.9982g ml⁻¹) (Ecuación 2).

$$EC(l) = \left(\frac{EC(g)}{\rho_{H_2O}(gml^{-1})} \right) \times \left(\frac{l}{1000ml} \right)$$

Ecuación 2

5.3.2.2 Preparación de los estándares para la medición de la producción de CO₂

Para cuantificar el CO₂ producido por el metabolismo de las bacterias en los microcosmos, se utilizó la relación del área bajo la curva y la concentración del

mismo, y a partir de esta determinación se cuantificaron muestras de concentraciones desconocidas. Los estándares para realizar la curva patrón, se prepararon en botellas ámbar de 110 ml con diferentes concentraciones de nitrógeno (N_2) y CO_2 , a partir de una mezcla gaseosa de $N_2:CO_2$ de relación 80:20, con un alto grado de pureza (5.0) (Cryogas).

En la elaboración de los estándares, las botellas fueron llenadas con agua y sumergidas en un recipiente con agua. Las botellas fueron burbujeadas con la mezcla de $N_2:CO_2$ desplazando totalmente el líquido por el gas, asegurando así, solo la presencia del gas inyectado (Figura 4) (Acosta, 2008).

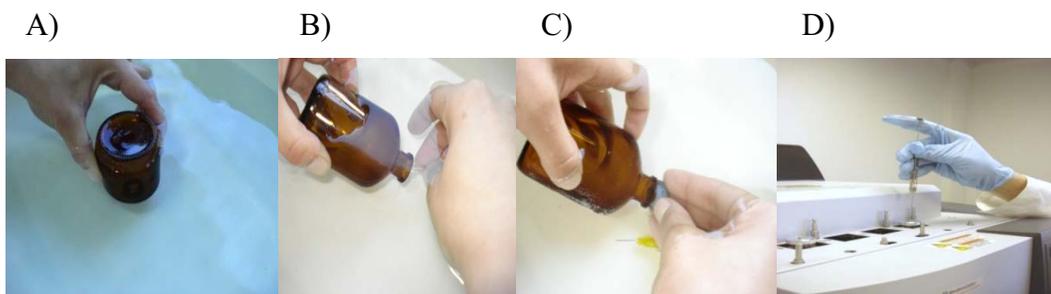


Figura 4. Fabricación de estándares para determinar la producción de CO_2 . A) Inmersión de las botellas con agua B) Burbujeo de $N_2:CO_2$; C) Sellamiento de los estándares y D) Inyección de los estándares.

Se realizó una curva patrón para cada montaje, ya que las condiciones entre montajes podía variar. Para elaborar la primera curva, se realizaron 7 estándares a los que se les retiraron diferentes volúmenes de mezcla (0ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml, 30ml), modificando el número de moles, y por ende la concentración presente en cada uno de ellos (Anexo 5).

Para obtener los estándares con bajas concentraciones, se utilizaron 2 botellas que se burbujearon con N_2 puro (grado 5.0) (Cryogas), y se les inyectó mezcla $N_2:CO_2$ (5ml

y 15ml) (Acosta, 2008); esto con el fin de generar una amplio rango (11.76 a 270.78 mg de CO₂/l) de concentraciones en la curva patrón, que permitan cuantificar el CO₂ que se produce en cada uno de los tratamientos y controles.

De la misma manera en que se fabricaron los patrones para la curva del primer montaje, se realizaron para el segundo montaje. A todos los patrones de las curvas se les cálculo la presión de acuerdo a la ley de los gases ideales para obtener la concentración CO₂ (Anexo 5). Las dos curvas fueron elaboradas en mg/l de CO₂ en función del área bajo el pico cromatográfico (Acosta, 2008).

5.3.2.3 Medición de CO₂ en los tratamientos evaluados

Se realizaron 2 lecturas por microcosmo, y cada bacteria evaluada se evaluó por duplicado (n=4). Los ensayos se realizaron por 13 d, con lecturas en los días 0, 3, 9 y 13. Antes de cada lectura se inyectaban patrones para rectificar las condiciones del método de corrida y la medición por parte del equipo.

Los datos obtenidos en los microcosmos se corrigieron con el control abiótico, para determinar la producción de CO₂ generada durante la biodegradación del fenol por cada uno de las bacterias evaluadas.

5.3.3 Coeficiente de respiración

El coeficiente de respiración (CR) permite relacionar la degradación del contaminante (HC's), con el desarrollo de la biomasa, la producción de subproductos tóxicos y el consumo de O₂ (Taok *et al.*, 2007; Acosta, 2008). Para que el consumo de O₂ este asociado a la mineralización del contaminante el CR debe estar entre 0.6 y 0.8 (Moller *et al.*, 1996; Acosta, 2008). La relación dada por el CR se calculó dividiendo los moles producidos de CO₂ por las moles consumidas de O₂, en los días 9 y 13 (Taok *et al.*, 2007; Barrena y Vázquez, 2006).

Se cálculo con la siguiente relación matemática:

$$CR = \frac{\# \text{ moles CO}_2}{\# \text{ moles O}_2}$$

Ecuación 3

5.4 Análisis estadístico

Se realizó una comparación múltiple (Tukey; ($p \leq 0.05$ y $p \leq 0.2$) entre los diferentes tratamientos (bacterias evaluadas) al final de los experimentos para evaluar diferencias significativas en el consumo de O₂ y producción de CO₂. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando JMP[®] versión 4.04.

Para el caso la producción de CO₂ se llevo a cabo un control de calidad, para determinar diferencias significativas entre los tratamientos en el tiempo (t=0 y t=13), utilizando la prueba t-student ($p < 0.05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Bacterias seleccionadas por su capacidad para degradar el fenol

Inicialmente, se evaluaron 57 bacterias en la línea de investigación de biorremediación para ambientes contaminados, que se encuentran conservadas a -80 °C y registradas en la colección de microorganismos del Departamento de biología de la Pontificia Universidad Javeriana (Tabla 7), con el propósito de seleccionar aquellas bacterias degradadoras de HC's que degraden fenol. Como resultado de este tamizaje, se obtuvieron 11 bacterias con la capacidad de utilizar el fenol (500 mg/l), como única fuente de carbono (Tabla 8), estos microorganismos crecieron en medio mineral líquido BH, a una concentración de 500 mg de fenol/l.

Tabla 8. Bacterias con capacidad degradadora de fenol

Código Cepario PUJ-M-Bio-USBA-	<i>Microorganismo</i>	Estudios en USBA
94	<i>Pseudomonas beteli</i>	Maldonado, 2004
99	<i>Acinetobacter sp.</i>	Guevara, 2002
102	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	Maldonado, 2004
110	<i>Stenotrophomonas monophila</i>	Vallejo, 2004
112	<i>Stenotrophomonas</i>	Vallejo, 2004
113	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Vallejo, 2004

Tabla 8. Bacterias con capacidad de degradar el fenol (continuación).

Código Cepario PUJ-M-Bio-USBA-	<i>Microorganismo</i>	Estudios en USBA
118	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	Vallejo, 2004
122	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Santos y Dueñas, 2006
170	S.D.	Maldonado, 2004
181	S.D.	Rondón y Salamanca, 2007
184	S.D.	Acosta, 2008.

SD: Sin Determinar

La capacidad para degradar este HC a una concentración de 500 mg de fenol/l, por parte de las bacterias seleccionadas del tamizaje, puede estar relacionada con mecanismos que desarrollan los microorganismos para resistir y sobrevivir a estas concentraciones de fenol que suelen ser bactericidas (Schie y Young. 2000).

Entre los mecanismos que presentan las bacterias para resistir altas concentraciones de fenol, se encuentra el cambio estructural de la membrana citoplasmática, en donde existen diferentes mecanismos como la isomerización de los ácidos grasos, lo que le permite alinear la membrana a una forma más rígida, dándole la posibilidad de utilizar el fenol en altas concentraciones. Estudios realizados por Heieper y col (1992) y Schie y Young (2000), mostraron como la capacidad de *Pseudomonas putida* para degradar concentraciones de 750 mg/l de este compuesto, se veía asociado a este mecanismo.

Otro mecanismo que es comúnmente utilizado por las bacterias, es la conversión de ácidos grasos insaturados a saturados. La cadena de ácidos grasos saturados puede generar un alineamiento y acercamiento en la membrana, lo que compensa el

aumento de la fluidez de la misma inducido por el fenol (Keweloh, *et al.*, 1991; Heipieper *et al.*, 1994).

Los géneros que presentaron capacidad para degradar el fenol fueron: *Acinetobacter sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Flavimonas sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Stenotrophomonas sp.* Todas bacterias Gram negativas, que poseen mayor incidencia en la degradación de fenol por su capa lipídica y los mecanismos a nivel de membrana; aunque las Gram positivas también presentan esta capacidad, pero con menos frecuencia (Koutny *et al.*, 2003).

Muchos estudios se han centrado en la biodegradación del fenol por diversos tipos de microorganismos. Entre las bacterias degradadoras de fenol se encuentran varias cepas de *Acinetobacter sp.*, que pueden utilizar este compuesto como única fuente de carbono y energía (Clausen *et al.*, 2000; Abd-El-Haleem *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2008). La cepa de *Acinetobacter*, estudiada en este trabajo es la PUJ-M-Bio-USBA-99 fue aislada de suelos de Arauca y evaluada previamente en USBA donde se ha demostrado su capacidad para degradar HC's (Maldonado, 2003; Guevara y Roldan, 2005; Acosta, 2008). Adicionalmente esta bacteria fue acondicionada a diferentes concentraciones de fenol, tolerando una concentración máxima de 200 mg/l de fenol (Rondón y Salamanca, 2007).

Bronberg y Durán (2001), atribuyen a *Chromobacterium*, la capacidad para degradar compuestos aromáticos con gran producción de oxidasas y deshidrogenas que le permiten metabolizar el fenol. El género *Flavimonas* es una bacteria Gram negativa que también produce deshidrogenasas lo que le confiere la capacidad de actuar sobre este compuesto. En el presente estudio estos dos microorganismos, *Chromobacterium* (PUJ-M-Bio-USBA-113), y *Flavimonas* (PUJ-M-Bio-USBA-118), fueron aisladas de suelos de Zipaquirá en un estudio realizado por Vallejo (2004).

Entre las bacterias comúnmente reportadas como degradadoras de HC's y aromáticos, las especies más reconocidas por la capacidad para degradar diferentes concentraciones de fenol (200-800 mg/l), son *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. putida* y *Ps. beteli* (Kapley *et al.*, 2001; Koutny *et al.*, 2003; Saravanan *et al.*, 2008). Estudios realizados por Elsayed y col (2003) observaron que *Ps. aeruginosa* posee gran capacidad para degradar el fenol y una alta tolerancia a este compuesto, asimismo determinaron que la ruta implicada en su degradación es la del metaclivage. Otros estudios reportan una cepa de *Pseudomonas* (*Ps putida* ATCC 1194), como una de las bacterias que toleran altas concentraciones de fenol (1000 mg/l) (Neujahr, 1991; Quilty *et al.*, 1999).

También se ha reportado a *Stenotrophomonas* en estudios, como un microorganismo con alta producción de enzimas involucradas en la degradación del fenol, lo cual permite utilizar el fenol para su metabolismo (Clausen *et al.*, 2000).

6.2 Características del suelo utilizado

El suelo utilizado para el presente estudio fue obtenido del bosque de la finca La Selva del departamento Risaralda, el cual hace parte de estudios de biodiversidad en USBA. En los estudios llevados a cabo hasta el momento, se ha observado que este suelo presenta una baja población microbiana y sumado a la esterilización del mismo, es favorable para la evaluación de las bacterias seleccionadas por su capacidad para degradar fenol sin ninguna interferencia por otros microorganismos.

Como control del suelo estéril se realizó un recuento de heterótrofos, en donde no se observó crecimiento. Esto permitió determinar el consumo de oxígeno y producción de CO₂. Sin embargo, se ha reportado que el proceso de esterilización por autoclave afecta la biodisponibilidad de los contaminantes evaluados. Es así, como Shaw y col (1999), llegaron a la conclusión que al esterilizar el suelo y reinocularlo se incrementa la adsorción y biodegradación del 2,4 diclorofenol, gracias a que el químico se difunde más rápido en la matriz y de esta manera se encuentra más

disponible para los microorganismos, esto se atribuye a transformaciones de pH, de la solubilidad del carbono orgánico y al movimiento de electrones en el suelo.

Después de la esterilización se encontró que el suelo presentaba una humedad de 48.5 ± 0.4 % (p/v), la cual fue ajustada a un 60% con agua desionizada estéril en todos los microcosmos para facilitar la biodegradación (Shaw *et al.*, 1999). Otro de los factores importantes que se midió en el transcurso de los ensayos, fue la temperatura ambiental en la que se encontraban los microcosmos, este factor en promedio se mantuvo en $24.4 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$, esta temperatura generalmente encontrada en suelos favorece el crecimiento microbiano (Kondrateva *et al.*, 2001; Polymenakou y Stephanou, 2005).

6.3 Análisis respirométrico de la biodegradación del fenol

La evaluación del consumo de O_2 y la producción de CO_2 sirvió como parámetro para monitorear la degradación del fenol por parte de los microorganismos seleccionados. Como lo menciona Critter y Ocol (2004), la medición de la respiración permite estudiar la actividad microbiana, en particular los procesos de mineralización, donde el consumo de O_2 y la producción de CO_2 dependen de factores como la biomasa microbiana, la temperatura, el pH, entre otros.

Durante los ensayos se observaron diferentes fases, que hacen referencia a los procesos de asimilación y degradación de los compuestos (para este caso el fenol). La primera fase hace referencia a la adaptación, en donde el consumo de O_2 y la actividad metabólica es baja; una fase exponencial, donde se incrementa el consumo de O_2 y la producción de CO_2 que puede ser atribuida a la degradación de los sustratos (fenol); y en algunos casos se pudo observar una fase estacionaria, donde el consumo de O_2 cesa, el compuesto es transformado lentamente a CO_2 , el sustrato o contaminante es escaso y la biomasa se mantiene constante (Gernaey *et al.*, 2001; Lors y Mossmann, 2004; Taok *et al.*, 2007).

Es así, como las curvas de respirometría se analizaron en la fase exponencial, fase que también ha sido utilizada en otros estudios respirométricos realizados en USBA (García y Garzón, 2005; Acosta, 2008).

6.3.1 Análisis del consumo de oxígeno en los microcosmos

Los controles abióticos (CA) y de suelo con el microorganismo de referencia (CS), presentaron en general un consumo mínimo de O₂ menor que el de las bacterias evaluadas. Esto indicó un bajo consumo de O₂ abióticamente y una baja presencia de materia orgánica en el suelo utilizado para el control CS. El control abiótico fue el utilizado para corregir todos los datos obtenidos, ya que el consumo de O₂ es el generado por los procesos abióticos y fisicoquímicos, como lo son la fotooxidación, adsorción/desorción, volatilización y oxidación del fenol (Akbal y Onar, 2003). El control suelo con el microorganismo de referencia, presentó una gran variabilidad a lo largo de todo del ensayo, por lo cual no fue usado para el estudio de los datos. Por otra parte, el control con diesel, (SR) indicó un adecuado funcionamiento de los equipos con el registro del consumo de O₂, lo que indica que el microorganismo degradó la sustancia de referencia, corroborando que el sistema empleado era el adecuado para la medición del consumo de O₂ (García y Garzón, 2005; Acosta, 2008).

La fase exponencial para cada uno de los microorganismos comenzó en diferentes días en estudio. La cepa PUJ-M-Bio-USBA-99 correspondiente a *Acinetobacter sp.* presentó una corta fase de adaptación (día 1), y uno de los mayores consumos de O₂ (Anexo 6)(Figura 5). Los estudios realizados por Dong y col (2008), reportan que cepas aisladas de suelo de *Acinetobacter sp.* tienen la capacidad de degradar desde 94 hasta 940 mg/l de fenol. De igual manera, la cepa PUJ-M-Bio-USBA-110 (*Stenotrophomonas monophila*), tuvo un consumo alto de O₂, en donde su fase exponencial empezó el día 4. Esta bacteria también ha demostrado en estudios preliminares que se están llevando en USBA la capacidad de degradar aceites (Roldan, 2008).

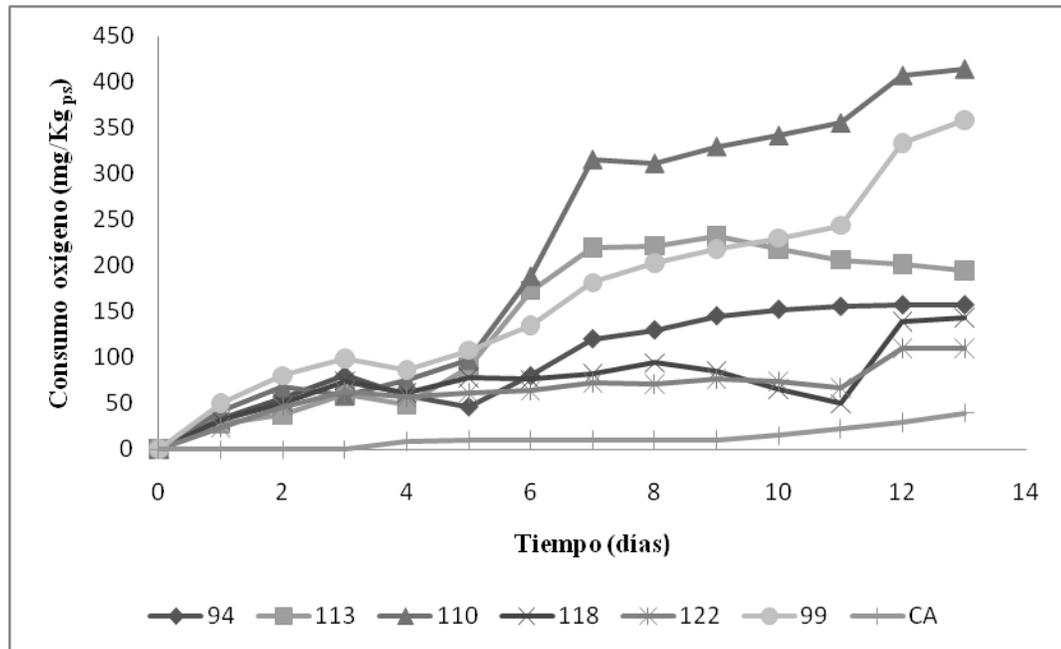


Figura 5. Medición del consumo de oxígeno, en la degradación de fenol durante 13 d. Se presenta el promedio de 3 lecturas.

Otra cepa que presentó un alto consumo de O_2 fue la cepa PUJ-M-Bio-USBA-102 identificada como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, seguida de la PUJ-M-Bio-USBA-112 (*Stenotrophomonas*), y la PUJ-M-Bio-USBA-181, una *Acinetobacter sp.* adaptada a una concentración de 200 mg/l de fenol en estudios realizados por Rondón y Salamanca (2007). En general, la fase exponencial inicio hacia el día 4 y el comienzo de la fase exponencial en todos los tratamientos fue muy cercana (Figura 6).

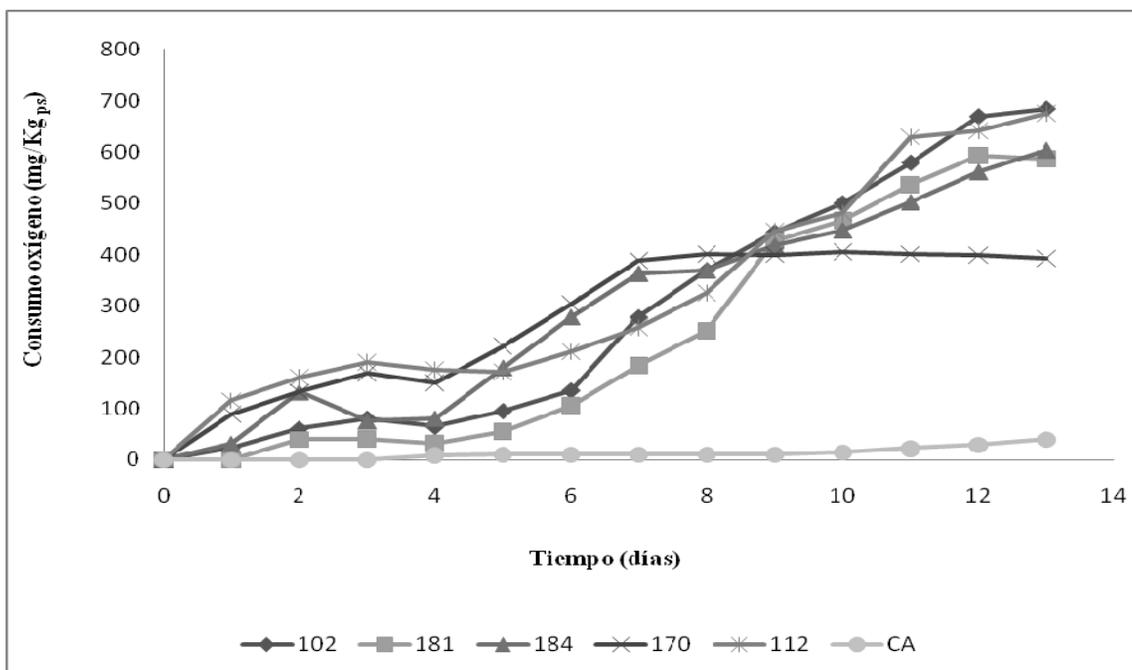


Figura 6. Medición del consumo de oxígeno, en la degradación de fenol durante 13 d. Se presenta el promedio de 3 lecturas.

Comparando todos los datos obtenidos del consumo de oxígeno en el día final (13 d) (Anexo 7), las cepas que presentaron un consumo significativamente mayor fueron las cepas PUJ-M-Bio-USBA-102, 112 y 181, en donde los géneros *Stenotrophomonas* y *Acinetobacter sp.* obtuvieron el mayor consumo de O₂. Estos géneros son reportados en la literatura como microorganismos con la capacidad para degradar compuestos aromáticos como el fenol en efluentes, sin embargo con este estudio se comprobó que no solo tienen actividad en efluentes, sino también en suelos.

Las cepas 118 y 122 obtuvieron los valores más bajos de la degradación. Esto puede ser atribuido a una escasa oxidación del fenol, en donde los microorganismos degradan el fenol a intermediarios iniciales de la ruta de la degradación como el γ cetodipatoetanol-lactona en el caso de la vía orto o el ácido protocatéquico para la vía meta (Barrios *et al.*, 2006).

6.3.1.1 Tasas de consumo de O₂

Para poder determinar las diferentes tasas de consumo de O₂ (mg O₂ Kg⁻¹d⁻¹), como un parámetro de la capacidad degradadora del fenol de las diferentes cepas evaluadas, se realizaron regresiones lineales de cada una de las curvas de consumo de O₂ de los microorganismos evaluados. Para realizar esta línea de tendencia, se tomaron los datos entre los días 4 al 12, fase exponencial, haciendo una regresión lineal (Tabla 9). Todos los datos fueron corregidos con el consumo de O₂ del control abiótico, y de cada una de las regresiones se obtuvo una ecuación de la recta, en donde la pendiente representa la tasa de consumo de O₂ (García y Garzón, 2005; Acosta, 2008).

Tabla 9. Tasas de consumo de O₂ desde el día 4 al 12.

Código de Cepario USBA	Pendiente (mg O ₂ Kg ⁻¹ _{ps} d ⁻¹)	D. S.	Intercepto (mg O ₂ Kg ⁻¹ _{ps})	r²
94	14.9	4.8	-2.851	0.8782
113	17.8	16.4	36.649	0.5528
110	40.4	17.2	-54.356	0.8653
118	3.5	4.2	53.439	0.1385
122	4.2	1.2	38.624	0.5610
99	27.1	3.8	-23.171	0.9435
102	79.5	10.6	-287.640	0.9864
181	77.7	14.6	-326.840	0.9733
184	54.8	13.9	-82.887	0.9509
170	32.3	37	103.540	0.5008
112	66.2	15.1	-158701	0.9491

D.S.: desviación estándar

r²: representa la cantidad de variabilidad de Y que puede ser explicado por X. Además de ser una medida de la relación lineal entre dos variables.

Las cepas PUJ-M-Bio-USBA-102 y 181, presentaron las mayores tasas de consumo de oxígeno, 79.0 y 77.7 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹, respectivamente. Tasas de consumo bajas comparadas con otros estudios realizados en USBA, García y Garzón (2005), utilizaron suelo contaminado con lodos aceitosos de petróleo donde la mayor tasa de consumo de O₂ fue de 802.28 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹ para el tratamiento con adición de sales inorgánicas simples (SIS) en el equipo HACH. Mientras que en los estudios de Acosta (2008), la mayor tasa de consumo de O₂ fue de 224.52 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹, y se presentó en el tratamiento de alta bioestimulación y baja bioaumentación en la degradación de Diesel. Claro esta que en estos estudios los contaminantes son sustancias menos tóxicas que el fenol y más fáciles de degradar por su estructura.

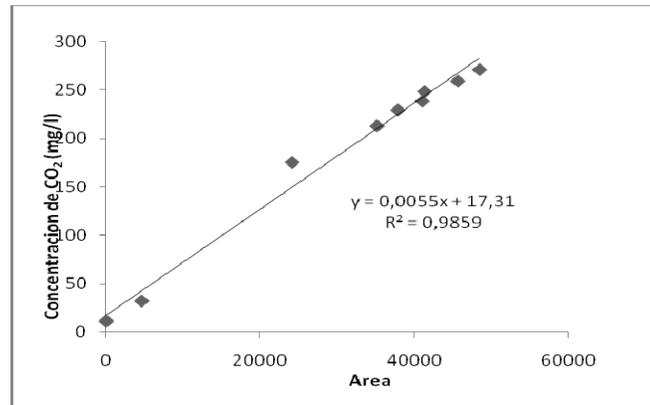
Comparado con estudios de fenol como los realizados por Kapley *y col* (2001), las tasas de consumo de O₂ por *Pseudomonas sp.* son menores en efluentes, y en contraste con los datos obtenidos en este estudio, indican que las bacterias evaluadas en este estudio son eficaces en la biodegradación del fenol. Estas diferencias en las tasas de consumo de O₂, puede deberse a que en efluentes pueden encontrarse compuestos que pueden inhibir la degradación del fenol como lo son, tiocianatos, sulfitos y cianidas (Kumaran y Paruchuri, 1997; Orupold *et al.*, 2001)

6.3.2 Producción de CO₂ en los microcosmos

6.3.2.1 Curva patrón para la medición de la producción de CO₂

Para calcular la concentración de CO₂ producida en cada uno de los microcosmos, se utilizó la curva patrón elaborada con estándares de diferentes concentraciones (Anexo 5). Se realizaron 2 curvas correspondientes a la del primer montaje y segundo montaje (Figura 7).

A)



B)

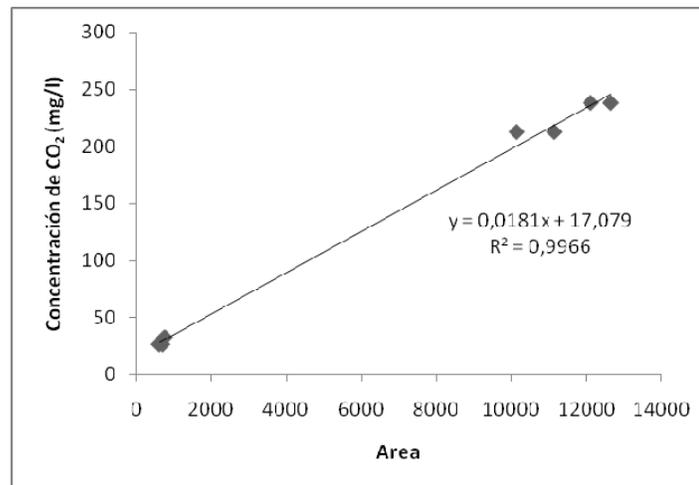


Figura 7. Curva patrón de la concentración de CO₂. A) Primer montaje: se utilizaron concentraciones de los estándares de 270,8; 259,0; 248,2; 238,3; 229,1; 212,7; 175,2; 11,7 y 32,5 mg de CO₂/l. B) Segundo montaje: se utilizaron concentraciones de los estándares de 238,3; 212,8; 32,5; 26,7 mg de CO₂/l.

6.3.2.2 Análisis de la producción de CO₂

El estudio se realizó en dos montajes. Por cada microcosmos fueron tomadas 4 lecturas. Los datos de todos los tratamientos obtenidos fueron corregidos por el

espacio de cabeza en cada microcosmos, que en promedio fue de 0.5859 l, valor obtenido de ecuación 1 y 2 (Acosta, 2008).

Al igual que en el consumo de O₂, los datos obtenidos fueron corregidos con el control abiótico. Para cada uno de los montajes se midieron controles independientes, puesto que las curvas y las concentraciones halladas en cada medición no presentaron la misma tendencia, por lo cual cada tratamiento fue corregido de acuerdo al control y el montaje al cual hacia parte.

Todos los tratamientos fueron corregidos por el control abiótico (Anexo 8), ya que la producción de CO₂ generada por este control es atribuida a procesos abióticos y fisicoquímicos, como lo son la fotoxidación, adsorción/desorción, volatilización y oxidación del fenol (Akbal y Onar, 2003); el control de suelo con diesel (SR), cumplió con el objetivo de determinar si el cromatografo media y cuantificaba CO₂, ya que se generó una respuesta por parte del equipo, asegurando que el sistema funcionaba adecuadamente. El control suelo con el microorganismo de referencia (CS), presentó en general un producción mínima de CO₂ pero con gran variabilidad de los datos, por lo cual no fue utilizada para el análisis de los datos de producción de CO₂ por parte de las bacterias evaluadas.

En relación con los resultados obtenidos en el primer montaje (figura 8), se pudo observar que la bacteria con mayor producción de CO₂ fueron la PUJ-M-Bio-USBA-110, 122 y 99. Estas bacterias corresponden a *Stenotrophomonas monophila*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter sp*, respectivamente. Los géneros *Stenotrophomonas* y *Acinetobacter*, concuerdan con resultados obtenidos en el consumo de O₂, corroborando de esta forma la eficiencia de estos microorganismos de metabolizar el fenol (Kumaran y Paruchuri, 1997; Clausen *et al.*, 2000; Koutny *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2008). El género *Pseudomonas sp.* está reportado como un microorganismo con alta capacidad para degradar el fenol y en general HC's, por sus mecanismos tanto genéticos como a nivel de membrana (Kumaran y Paruchuri, 1997; Orupold *et al.*, 2001; Swapna *et al.*, 2002; Koutny *et al.*, 2003).

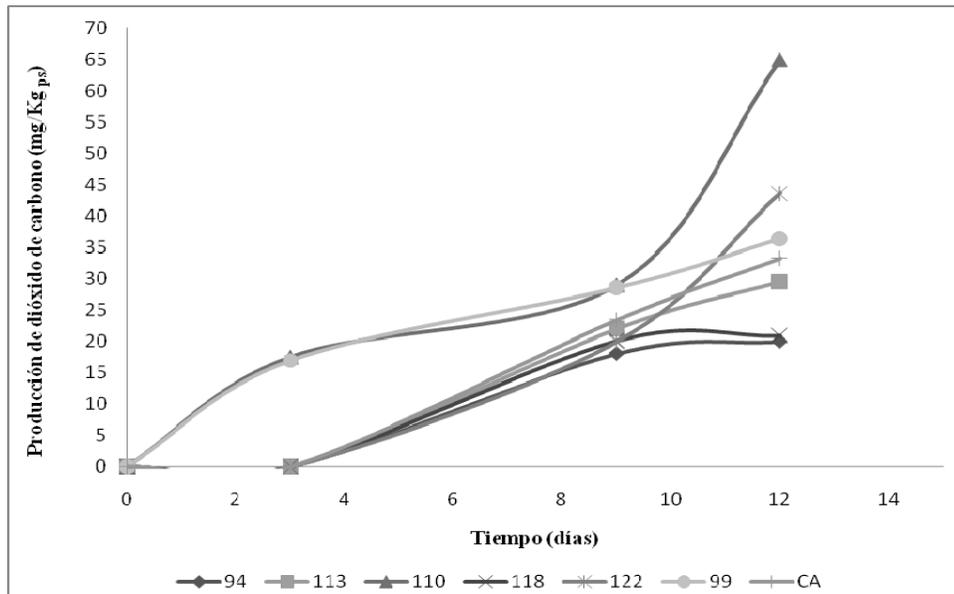


Figura 8. Producción de CO₂ durante la degradación de fenol durante 13 d (primer montaje). Se presenta el promedio de 4 lecturas .

Para el segundo montaje las cepas con mayor producción de CO₂ fueron las 102 (*Stenotrophomonas acidaminiphila*), 181 (*Acinetobacter sp*), y 170 (sin identificar) (Figura 9), que en comparación con la producción de CO₂ del primer montaje, se presentan los mismos géneros bacterianos. Pero al comparar las concentraciones de este montaje con el anterior montaje, en el segundo son mayores, lo que refleja un aumento de la actividad metabólica frente al fenol por parte de estos microorganismos.

Al comparar las concentraciones de CO₂ en todos los tratamientos evaluados, las bacterias que presentaron diferencias significativas en el primer montaje fueron la cepa PUJ-M-Bio-USBA-110, que presentó diferencia significativa con las cepas PUJ-M-Bio-USBA-94, 99, 113 y 118 en el día 13.

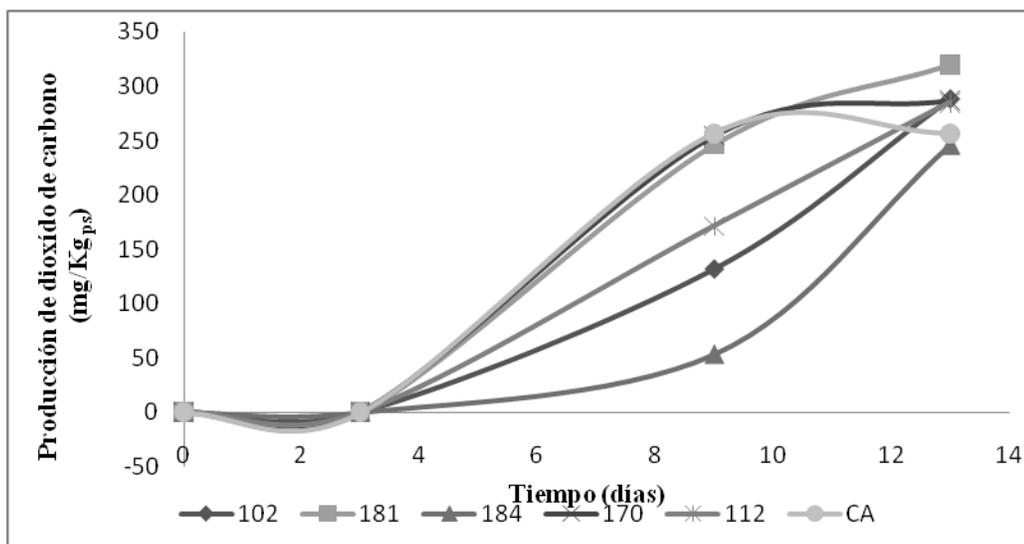


Figura 9. Producción de CO₂ en la degradación de fenol durante 13 d (segundo montaje). Se presenta el promedio de 4 lecturas .

Para el segundo montaje, la cepa 181 presentó una diferencia significativa con todas las cepas evaluadas en ese montaje, y la cepa 102 presentó diferencia significativa con las cepas 184 y 112, indicando que la cepa 181, fue la mejor por ser la única que presentó diferencia significativa con todas (Anexo 9).

Algunas bacterias tuvieron una producción de CO₂ escasa y menor que la del control abiótico indicando que pueden verse inhibidas, o no degradan el fenol completamente, aunque si pueden ser tolerantes a este compuesto.

6.3.2.3 Tasas de producción de CO₂

Al igual que las tasas de consumo de O₂, las tasas de producción de CO₂ se determinaron por regresión lineal de la fase exponencial (3-13 días), en las curvas de cada tratamiento.

La cepa que presentó las mayores tasas de producción de CO₂ en comparación con los demás tratamientos, fue la cepa 181 (52,7 mg O₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹) (Tabla 10). En comparación con la cepa 99 que presentó tasas negativas indicando una relación inversa a la producción de CO₂ al transcurrir el tiempo. Este fenómeno puede verse

relacionado con alguna inhibición al transcurrir el tiempo o una ineficaz mineralización del fenol a CO₂. Contreras y col (2008) y Dong y col (2008), sugieren que algunas bacterias pueden verse afectadas por el fenol, generando cambios en la función de la membrana y la relación de lípidos-proteínas en esta.

Tabla 10. Tasas de producción de CO₂ desde el día 3 al 13.

Código	Tasas de producción de CO₂ (mg CO₂Kg⁻¹ ps d⁻¹)	D. S.	r²
94	ND	ND	ND
113	0.02	0.4	0.0132
110	8.93	46.8	0.2154
118	ND	ND	ND
122	11.9	22.7	0.6447
99	-5.5	18.8	0.3642
102	26.2	72.2	0.6447
181	52.7	25.3	0.9662
184	4.8	9.2	0.6447
170	36	176.9	0.2145
112	3.3	73.5	0.0132

D.S.: desviación estándar

ND: No determinado, hace referencia a lecturas menores al control abiótico.

r²: representa la cantidad de variabilidad de Y que puede ser explicado por X. Además de ser una medida de la relación lineal entre dos variables.

Las tasas respiratorias obtenidas son bajas en comparación a otros estudios de respirometría con HC's, sin embargo para el caso del fenol se consideran altas, ya que la tasa de producción de CO₂ para la cepa 181 fue de 52.7 mg CO₂Kg⁻¹_{ps} d⁻¹, a una concentración de fenol de 500 mg/l, en comparación con la tasa obtenida en los estudios de Orupold y col (2001), con efluentes de compuestos fenólicos, en donde la mayor tasa respiratoria que se obtuvo fue de 89.8 mg CO₂l⁻¹, teniendo en cuenta que la concentración de fenol era menor a 100 mg /l.

6.3.3 Coeficientes de respiración en la biodegradación del fenol.

Entendiendo que los estudios de respirometría miden e interpretan la respiración, dada en un consumo de O₂ y en la producción de CO₂, estos son útiles para cuantificar y entender los procesos de la actividad microbiana, en especial los de mineralización (Gernaey *et al.*, 2001; Critter *et al.*, 2004). Es así como el coeficiente de respiración (CR) permite interrelacionar la degradación de un compuesto, con generación de biomasa y la producción de metabolitos secundarios (tóxicos) (Taok *et al.*, 2007; Acosta, 2008; Barrena *et al.*, 2008).

En procesos de degradación, el CR permite inferir si el compuesto se mineralizó a CO₂, y si el consumo de O₂ es debido a procesos de oxidación propios de una degradación aerobia (Critter *et al.*, 2004). Para considerar que esto se realiza de esta manera, el CR debe estar en un rango de 0.6 a 0.8, el cual se refiere a mineralización completa atribuida al consumo de O₂. Este coeficiente se determina calculando el número de moles de CO₂ sobre el número de moles de O₂ (Taok *et al.*, 2007; Acosta, 2008).

En este estudio se evaluaron los CR para todas las cepas analizadas durante los días 9 y 13, días donde ambos parámetros (consumo de O₂ y producción de CO₂) se encontraban en la fase exponencial (Tabla 11). Los resultados muestran que el día 9 la cepa PUJ-M-Bio-USBA-170, presentó un CR por encima del rango (>0.8), lo que puede indicar un efecto tóxico del fenol frente a esta bacteria, más que por un proceso de mineralización completa y para las demás cepas el CR se vio asociado a

procesos de crecimiento y/o formación de biomasa. Por otra parte, en el día 13 se observa que la cepa 122 y 181 presentaron procesos de mineralización del fenol, en comparación con las demás, que no llegaron a obtener este proceso.

Estos procesos de mineralización se corroboraron con la cepa PUJ-M-Bio-USBA-181 en un ensayo adicional de cromatografía de gases acoplada a un detector de masas, donde se tomaron muestras del espacio de cabeza y del suelo (de este último por Head Space, Anexo 10), donde se encontró en mayor proporción el CO₂, seguida de moléculas como acetaldehído y piruvato, que son intermediarios de la degradación aerobia del fenol por la vía meta, la cual es la más sugerida por literatura (Barrios *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2008). Cabe resaltar que en el cromatograma no hubo fenol, lo cual ratifica la eficiencia de este microorganismo en la mineralización del fenol.

Tabla 11. Coeficiente respiratorio en los días 9 y 13.

Código de Cepario USBA	Días	
	9	13
94	0.0	0.0
113	0.0	0.0
110	0.1	0.4
118	0.0	0
122	0.0	0.9
99	0.1	0.2
102	0.0	0.3
181	0.4	0.7
184	0.0	0.1
170	0.9	0.5
112	0.4	0.0

7. CONCLUSIONES

- De las 57 bacterias degradadoras de HC's de la colección de microorganismos de la línea de biorremediación y biodegradación, se encontraron 11 bacterias con la capacidad para degradar fenol.
- De las 11 bacterias aisladas, los géneros que presentaron una degradación más eficiente, en relación a los parámetros respirométricos, fueron *Stenotrophomonas*, y *Acinetobacter*.
- Se corroboró que la respirometría es un método eficiente para evaluar las diferentes bacterias (Ttos) durante la degradación del fenol en suelos contaminados.
- La bacteria que presentó la mayor tasa de consumo de O₂ fue la PUJ-M-Bio-USBA-102 (*Stenotrophomonas acidaminiphila*), con 79 mg O₂ Kg⁻¹_{ps} d⁻¹, seguido de la PUJ-M-Bio-USBA-181 que es a un *Acinetobacter sp.* adaptado al fenol en estudios anteriores.
- La cepa PUJ-M-Bio-USBA-181(*Acinetobacter sp.*), presento la mayor tasa para las tasas de producción de CO₂ (52,72 mg O₂ Kg⁻¹_{ps} d⁻¹).
- El coeficiente de respiración (CR), permitió determinar que la bacteria 122 y 181 llevaron a cabo el proceso de mineralización del fenol bajo las condiciones de este estudio..
- La bacteria 181 presentó una mineralización del fenol.

- Con los resultados obtenidos en el presente estudio se recomienda la cepa 181 correspondiente a *Acinetobacter* sp., sea usada en caso de derrame o contaminación de fenoles en suelo.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda en estudios posteriores para evaluación de la capacidad degradadora de bacterias con el uso de la respirometría:

- Utilizar un equipo que genere mayor repetitividad de los datos para la evaluación de consumo de O_2 .
- Medir factores que pueden afectar la degradación del fenol, como pH y temperatura dentro de los microcosmos.
- Evaluar las cepas seleccionadas en estudios de biorremediación de suelos contaminados con fenol en campo.
- Evaluar el consumo de la degradación de fenol a través del tiempo y relacionarlo con el consumo de O_2 y la producción de CO_2 .
- Prolongar los días de evaluación en la producción de CO_2 .
- Ampliar el rango de las concentraciones de fenol.

9. BIBLIOGRAFIA

- **ABDEL-EL-HALEEM, D.** 2003. Acinetobacter: environmental and biotechnological applications. *African Journal of Biotechnology* (4):71-74.
- **ACOSTA, G.** 2008. Evaluación por respirometría de la bioestimulación con nutrientes y de la bioaumentación con *Acinetobacter sp.* en la biorremediación de suelos contaminados con diesel. Trabajo de grado de maestría. . Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- **AKBAL, F. y ONAR, N.** 2001. Photocatalytic degradation of phenol. *Environmental Monitoring and Assessment* (83): 295–302.
- **ALBERTARIO, M., CONTRERAS, E. y BERTOLA., N.** 2007. Degradación biológica de fenol utilizando técnicas respirométricas. *Aidis de Ingeniería y Ciencias Ambientales.* (1):1-11
- **ALEMZADEH, I., VOSSOUGH, F. y HOUSHMANDI., M.** 2007. Phenol Biodegradation by Rotating Biological Contactor. *Biochemical Engineering Journal.* 11: 19–23.
- **ALEXANDER, M.** 1991. Biodegradation and Bioremediation. 2nd Edición. Academic. San Diego, United States. 453.
- **ALLAN, I., SEMPLE, K., HARE, R. y REID, J.** 2006. Aerobic and Anaerobic Biodegradation of Phenol Derivatives in Various Paddy Soils. *Science of the Total Environment.* 3 (67): 979-987.
- **ANNADURAI, G., LING, L., LEE, J.** 2007. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas pictorum* on immobilized with chitin. *African Journal of Biotechnology.* 6 (3): 296-303.
- **ARGEMI, F., CIANNI, N., y PORTA, A.** 2005. Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39 (3): 291-300.
- **ATLAS, R. y BARTHA, R.** 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4th Edición. Pearson Educación, S.A. España. 596.
- **ATLAS, R. Y BARTHA, R.** 2005. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 5th edición. Pearson Educación, S.A. España. 620.

- **AVILA, M.** 1999. La Biorremediación, Procesos y Aplicaciones. Instituto de Investigación Tecnológica. Escuela Politecnica Nacional. Ecuador.
- **BARRENA, R. y VÁZQUEZ, F.** 2006. The use of respiration indices in the composting process: a review. *Waste Managemebt & Research* (24): 37-47.
- **BARRIOS, A., BARBOT, E., MARROT, B., MOULIN, P. y ROCHE, R.** 2006. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. *Journal of Membrane Science* (281)288–296.
- **BERGAUER, P., FONTEYNE, P., NOLARD, N., SCHINNER, F. y MARGESIN, R.** 2005. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere* (59): 909-918.
- **BOSSERT, I y BARTHA, R.** 1984. The Fate of Petroleum in Soil Ecosystems. *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York. 434-476.
- **BRIGANTI, F., PESSIONE, E., GIUNTA, C. y SCOZZAFAVA, A.** 1997. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter* radioresistens. *FEBS Letter* (416):61-64.
- **BRONBER, N y DURÁN, N.** 2001. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. *Journal of Molecular Catalysis* (11): 463-467.
- **BROOK, T., WARREN, S. Y ZYTNER, R.** 2001. Biodegradation of diesel fuel in soil under various nitrogen addition regimes. *Soil and Sediment Contamination* 10 (5): 539-553.
- **BUITRON, G., MORENO. y G. MORENO, I.** 2007. Eliminación biológica de altas concentraciones de fenol presente en aguas residuales. *Revista Aidis de Ingenieria y Ciencias Ambientales*. 1:1-7
- **CALABRESE, V., ELSAVAGE, R., BISSONNETTE, G y SEXTONE, A.** 1993. Mobility and enhanced biodegradation of a diluted waste oil emulsion during land Treatment. *Journal of Industrial Microbiology*. (2): 13-20.
- **CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT** (Environment Canada). 2000. Priority substances list assessment report: phenol. Health Canada. ISBN 0-662-28401-1. Cat. no. En40-215/45E

- **CHIOU, C. y JUANG, R.** 2007. Photocatalytic degradation of phenol in aqueous solutions by Pr-doped TiO₂ nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials* (149): 1-7.
- **CHITIVA, L. y DUSSÁN, J.** 2003. Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas* spp. en biorremediación de fenol. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2: 5-10
- **CLAUSEN, C.** 2000. Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. *Waste Management & Research* (18): 264-268.
- **CLAVIJO, S. y BRUNETTO, M.** 2006. Determinación de ácidos grasos y triglicéridos en manteca de cacao por cromatografía de gases. Trabajo de Grado. Universidad de los Andes. Departamento de Química. Bogotá, Colombia.
- **CONTRERAS, E., ALBERTARIO, M., BERLOTA, N. y ZARITZKY, N.** 2008. Modelling phenol biodegradation by sludges evaluated through respirometric techniques. *Journal of Hazardous Materials* (158): 366-374.
- **CRITTER, S., FREITAS, S. y AIROLDI, C.** 2004. Comparison of microbial activity in some Brazilian soils by microcalorimetric and respirometric methods. *Thermochimica Acta* (410): 35-46.
- **DELGADO, Y. y BRUNETTO, M.** 2000. Determinación de cocaína y sus metabolitos en muestras de pelo por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. Trabajo de grado. Universidad de los Andes. Departamento de Química. Bogotá, Colombia
- **DONG, X., HONG, Q., HE, L., JIANG, X. y LI, S.** 2008. Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* (62): 257-262.
- **EHRT, S., SCHIRMER, F. y HILLEN, F.** 1995. Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Molecular Microbiology* (18): 13-20
- **ELLIS, R.** 2004. Artificial Soil Microcosms: a tool for studying microbial autecology under controlled conditions. *Journal of Microbiology Methods* (56): 287-290.
- **EL-SAYED, W., IBRAHIM, M., ABU-SHADY, M., EL-BEIH, F., OHMURA, N., SAIKI, H. y ANDO, A.** 2003. Isolation and characterization of phenol-catabolizing from a coking plant. *Biotechnology and Biochemistry* 67 (9): 2026-2029.

- **ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA).** 1997. Testing Conset Order for Phenol. Washington D.C. United States.
- **ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA).** 2000. Toxicological Review Phenol CAS No.108-95-2. Washington D.C. United States.
- **ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA).** 2003. Report of Bioavailability of Chemical Waste with Respect to the Potential for Soil Bioremediation. Washington D.C. United States.
- **ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA).** 2005. Profile of the Healthcare Industry. Washington D.C. United States.
- **EWEIS, B., ERGAS, J., CHANG, Y. y SCHROEDER, D.** 1999. Principios de Biorrecuperación. Mac Graw Hill .España.
- **FARHADIAN, M., VACHELARD, C., DUCHEZ, D. y LARROCHE, C.** 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology* (99): 5296-5308. *Pediatría*
- **FERRÍS, J., ORTEGA, J., LÓPEZ, J., GARCÍA, I., ALIAGA, A. y CÁNOVAS, V.** 2003. Autobuses escolares y motores diesel: contaminación atmosférica, exposición pediátrica y efectos adversos en la salud humana. *Revista Española* 59(2): 132-145.
- **FIÚZA, A. y VILA, M.** 2005. An Insigh into Soil Bioremediation Through Respirometry. *Environmental International* 1 (3):179-193.
- **GAJNAR, A y ZAGORC, J.** 2003. Comparison of diethylene glycol and phenol biodegradability by different test methods. *Arh Hig Rada Toksikol* .54:189-195
- **GARCÍA, E. y GARZÓN, L.** 2005.Evaluación de bioestimulación en Suelos con Hidrocarburos utilizando Respirometría. Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- **GERNAEY, A., PETERSEN, B., OTTOY, J. y VANROLLEGHEM, P.** 2001. Activated sludge monitoring with combined respirometric titrimetric measurements. *Water Research* 35 (5): 1280-1294.
- **HAMBRICK, G., DELAUNE, R. y PATRICK, W.**1980. Effect of estuarine sediment pH and oxidation reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Applied. Environmental Microbiology.* (40): 365-369.

- **HEESCHE-WAGNER, K., SCHWARZ, T. y KAUFMANN, M.**1999. Phenol degradation by an enterobactrium: *Klebsiella* strain carries a TOL-Like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase. *Canadian Journal of Microbiology* 45 (2):162-172.
- **HEIPIEPER, H., DIEFENBACH, R., KEWELOH, H.**1992. Conversion of *cis* Unsaturated Fatty Acids to *Trans*, a Possible Mechanism for the Protection of Phenol-Degrading *Pseudomonas putida* P8 from Substrate Toxicity. *Applied. Environmental. Microbiological.* (58):1847-1852.
- **IGAC.**1979. Olarte, L. Métodos analíticos del laboratorio de suelos. Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), Subdirección agrologica. Ministerio de Hacienda y crédito público. Cuarta edición. Bogotá, D.C. Pp: 95-97, 61-67.
- **IGAC.**1995. Suelos de Colombia: Origen, evolución, clasificación, distribución y uso. Malgo, D., Pulido, C., Llinas, R y Chamorro, C. República de Colombia. Ministerio de Crédito Público. Bogotá-Colombia. Pp 469-483
- **INGLIS, D., JOHNSON, D., KAWCHUK, L., GOETTEL, M.** 1998. Effect of soil texture and soil sterilization on susceptibility of ovipositing grasshoppers to *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* (71): 73-81
- **INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS).** 1994. Environmental Health Criteria 161: Phenol. Finland, United States. 151.
- **KAPLEY, A., TOLMARE, A. y PUROHIT, H.** 2001. Role of oxygen in the utilization of phenol by *Pseudomonas* CF600 in continuous culture. *Journal of Microbiology & Biotechnology* (17): 801-804.
- **KEWELOH, H., DIEFENBACH, R. y REHM, H.** 1991. Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of membrane lipids. *Archied Microbiology* (157):49-53.
- **KHLEIFAT, K.** 2007. Biodegradation of Phenol by *Actinobacillus sp.*: mathematical interpretation and effect of some growth conditions. *Bioremediation Journal.* 11 (3):103-112.
- **KIJCHAVENGKUL, T., AURAS, R., RUBINO, M., NGOUAJIO, M. y FERNANDEZ, R.T.** 2006. Development of an automatic laboratory-scale respirometric system to measure polymer biodegradability. *Polymer Testing* (25): 1006–1016.

- **KONDRATEVA, L., KARETNIKOVA, E. y RAPOPORT, V.** 2001. Degradation of phenol compounds by microbial communities of the Amur estuary. *Journal Marine Biology* 6 (27): 353-361.
- **KOUTNY , M., RUZICKA, J. y CHLACHULA, J.**2003. Screening for Phenol-degrading Bacteria in Thepristine Soils of South Siberia. *Applied Soil Ecology* (23) :79–83.
- **KUEH, C. y LAM, J.** 2008. Monitoring of toxic substances in the Hong Kong marine environment. *Marine Pollution Bulletin* (57) 744–757.
- **KUMARAN, P. y PARUCHURI, L.** 1997. Kinetics of phenol biotransformation. *Water Research* (31):11-22.
- **LATORRE, N.** 2007. Evaluación de medios de cultivos de altos y bajos nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los Andes. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia.
- **LEAHY, J., COLWELL, R.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54(3):305-315.
- **LORS, C. Y MOSSMANN, J.** 2004. Contribution of microcosm and respirometric experiments to PAHs intrinsic biodegradation in the soil of a former coke site. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 91–105.
- **LUO, Q., ZHANG, X., WANG, H. y QIAN, Y.** 2005. The use of non-uniform electrokinetics to enhance in situ bioremediation of phenol-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* (121): 187-194.
- **MADIGAN, M., MARTINKO, J. Y PARKER, J.** 2003. Biología de los Microorganismos. 10th Edición. Prentice Hall. Madrid - España. 130-140, 151, 630-357
- **MALDONADO, C.** 2004. Evaluación de los procesos de atenuación natural de hidrocarburos de petróleo utilizados como supresores de polvo en carreteras sin pavimentar. Trabajo de grado. Departamento de Ciencias Básicas programa de biología y microbiología. Universidad de los Andes. Bogota, Colombia.
- **MARGESIN, R y SCHINNER, F.** 1997a. Bioremediation of diesel oil contaminated alpine soil at low temperature. *Applied and Enviromental Microbiology*. (47): 462-468

- **MARGESIN, R y SCHINNER, F.** 1997b. Laboratory Bioremediation Experiments with Soil from a Diesel Oil Contaminated Site Significant Role of Cold Adapted Microorganisms and Fertilizer. *Journal Chemical Technology and Biotechnology* (70): 92-98
- **MARGESIN, R., ZIMMERBAUER, A. y SCHINNER, F.** 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* (40): 339-346.
- **MAYER, K., BENNER, S., FRIND, E., THORNTON, S., LERNER, D.** 2001. Reactive transport modeling of processes controlling the distribution and natural attenuation of phenolic compounds in a deep sandstone aquifer. *Contaminant Hydrology* (53): 341-368.
- **MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE.** 2002. Guía ambiental para la formulación de planes de pretratamiento de efluentes industriales. Fotolito América Ltda. Bogotá, Colombia.
- **MINISTERIO DE SALUD.** 1984. Decreto No. 1594. Usos del agua.
- **MINISTERIO DE SALUD.** 1993. Resolución 10255. Importación, formulación, comercialización de productos agrícolas.
- **MURCIA.** 2007. Riesgo Químico- Accidentes Graves, Fenol. Murcia, España.
- **NEUHAUSER, E.F., P.R. DURKIN, M.R. MALECKI y M. ANATRA.** 1986. Comparative toxicity of ten organic chemicals to four earthworm species. *Comparative Biochemistry Physiology*. 83C: 197–200.
- **NEUHAUSER, E.F. y C.A. CALLAHAN.** 1990. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemicals. *Soil Biology & Biochemistry*. 22: 175–179.
- **NEUJAHR., H.** 1991. Fenol hydrolases. chemistry and biochemistry of flavoenzyme. Ed Muller, F., CRS Press., Boca Ranton London. 65-85
- **OH, Y., CHOI, W., LEE, Y., CHOI, S. y KIM, S.** 2000. Biological treatment of oil-contaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flame ionization detector and respirometric analysis. *Biotechnology Letters* (22): 595–598.
- **ORGANIZACIÓN DE ECONOMÍA PARA LA COOPERACIÓN Y DESARROLLO (OECD).** 2001. Guideline for the testing of chemicals 310. Guidelines for the testing of chemicals. Ready Biodegradability-CO₂ in sealed vessels (Headspace Test).16.

- **ORUPOLD, K., MASIRIN, A. y TENNO, T.** 2001. Estimation of biodegradation of phenolic compounds on activated sludge by respirometry. *Chemosphere* (44): 1273-1280.
- **PARDO, J., PERDOMO, M. y BENAVIDEZ, J.** 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 2 (2): 1-108.
- **PARÉS, R. y JUARÉZ, A.** 2002. Bioquímica de los Microorganismos. Editorial Reverté, S.A. Barcelona. España. 380.
- **PISKONEN, R., KAPANEN, A., MANSIKKA, T. y RYTKONEN, J.** 2002. Evaluation of bioremediation treatments in a shoreline-simulating microcosm. *Bioremediation Journal* 6(2): 143-158.
- **POLYMENAKOU, P. y STEPHANOU, E.** 2005. Effect of temperature and additional carbon source on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonas*. *Biodegradation* (16): 403-413.
- **PRADHAN, N. y INGLE, A.O.** 2007. Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *International Biodeterioration & Biodegradation* (60): 103-108.
- **QUILTY, B. Y FARRELL., A.** 1999. Degradation of monochlorophenols by mixed microbial community via meta-cleavage pathway. *Biodegradation*. (10):353-362.
- **RAZO, D.** 2003. Biorremediación de suelos contaminados con fenol. Tesis de Licenciatura en Quimicofarmacobiología. Universidad de las Américas de Puebla. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Química y Biología. Puebla, México.
- **REUSCHENBACH, P., PAGGA, U., STROTMANN, U.** 2003. A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Research* (37): 1571-1581.
- **REYES, A.** 2008. Memorias curso de Cromatografía. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- **RODRÍGUEZ, A. y TORRES, C.** 2001. Evaluación de la capacidad degradadora de fenol por *Pseudomonas fluorescens* P4 inmovilizada en soportes orgánicos para el desarrollo posterior de un sistema bioanalítico. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia

- **ROLDAN, F.** 2008. Comunicación personal.
- **RONDÓN, D. y SALAMANCA, G.** 2007. Cinética de degradación de fenol por *Acinetobacter sp.* Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química. Bogotá, Colombia.
- **ROWE, E.L., R.J. ZIOBRO, C.J.K. WANG y C.W. DENCE.** 1982. The use of an alga *Chlorella pyrenoidosa* and a duckweed *Lemna perpusilla* as test organisms for toxicity bioassays of spent bleaching liquors and their components. *Environmental Pollution*. (Ser. A) 27: 289–296.
- **ROY, K. y POPELIER, P.** 2008. Exploring predictive QSAR models for hepatocyte toxicity of phenols using QTMS descriptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (18): 2604–2609.
- **SANTOS, L., y DUEÑAS, M.** 2006. Evaluación de la bioestimulación (bacterias nativas y comerciales) en la biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados. Trabajo de grado. Universidad Industrial de Santander. Departamento de Biología. Bucaramanga, Colombia.
- **SARAVANAN, P., PAKSHIRAJAN, K. y SAHA, P.** 2008. Biodegradation of phenol and *m*-cresol in a batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas sp.* *Bioresource Technology* (99): 8553-8558.
- **SCHEINER, S. y GUREVITCH, J.** 2001. Design and analysis of ecological experiments. 2nd Edition, Oxford University Press. Oxford, England. 415.
- **SCHIE, M. y YOUNG, LILY.** 2000. Biodegradation of Phenol: Mechanisms and Applications'. *Bioremediation Journal*. 4:1, 1 - 18
- **SGOUNTZOS, I., PAVLOU, S., PARASKEVA, C. y PAYATAKES, A.** 2006 Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* in sand beds during biodegradation of phenol. *Biochemical Engineering*. 30 :164–173
- **SHAW, L., BEATON, Y., GLOVER, L., KILLHAM, K. y MEHARG, A.** 1999. Re-inoculation of autoclaved soil as a non-sterile treatment for xenobiotic sorption and biodegradation studies. *Applied Soil Ecology* (11): 217-226.
- **SHAWABKEHA, R., KHLEIFAT, K., AL-MAJALI, I. y TARAWNEH, K.** 2007. Rate of biodegradation of phenol by *Klebsiella oxytoca* in minimal medium and nutrient broth conditions. *Bioremediation Journal* 11(1): 13-19.

- **SHIBATA , A., INOUE,Y. y KATAYAMA, A.** 2006. Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils. *Science of the Total Environment* 3 (67): 979–987.
- **SKOOG, D., HOLLER, E. y NIEMAN, T.** 2001.Principios de análisis instrumental. 5th Edición. Mc Graw Hill. Madrid, España.1024.
- **SONG, H Y BARTHA, R.** 1990. Effects of jet fuel spill on the microbial community of soil. *Applied and Enviromental Microbiology*. 56 (3): 646-651.
- **SUAREZ, M.** 1993. Degradación de los ácidos 3 y 4-hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense. Facultad de Ciencias Puras. Madrid, España.
- **SWAPNA, T., SARFARAZ, S., MISHRA, L. y IYENGAR, L.** 2002. Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial cultura. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** (18): 57-63.
- **SYLVIA, D.** 2005. Principles and Applications of soil Microbiology. Prentice Hall. Nex Jersey, United Satates.640.
- **TAO, X., LU, G., DANG, Z.,YANG, C. y YUN, X.** 2007. A phenanthrene-degrading strain *Sphingomonas sp.* GY2B isolated from contaminated soils. *Bio Process Biochemistry* (42): 401–408
- **TAOK, M., COCHET, N., PAUSS, A. y SCHOEFS, O.** 2007. Monitoring of microbial activity in soil using biological oxygen demand measurement and indirect impedancemetry. *European Journal of Soil Biology* (43): 335-340.
- **THOMAS, S., SARFARAZ, S., MISHRA, L. y IYENGAR., L.** 2002. Degradation of phenol and phenolic compounds by a defined denitrifying bacterial culture. *Microbiology & Biotechnology* (18): 57-63.
- **TISLER, T. y KONCAN, J.**1995. Relative sensitivity of some selected aquatic organisms to phenol. Bull. Environ. *Contamination and Toxicology*. 54: 717–723.
- **TREMIER, A., GUARDIA, A., MASSIANI, C., PAUL, E. y MARTEL, J.** 2003. A Respirometric Method for characterizing the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted. *Bioresource technology* (96): 169-180.

- **TREVORS, J.** 1996. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *Journal of Microbiological Methods* (26): 53-59.
- **TSUTSUI, T., N. HAYASHI, H. MAIZUMI, J. HUFF y BARRETT, J.C.** 1997. Benzene, catechol, hydroquinone and phenolinduced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutation Research*. 373: 113–123
- **TZORIS, A., CANE, D., MAYNARD, P. Y HALL, E.** 2002. Tuning the parameters for fast respirometry. *Analytica Chemical Acta* (460): 257-270.
- **VAHAOJA, P., PILTONEN, P., HYVONEN, A., NIINIMAKI, J., JALONEN y J., KUOKKANEN, T.** 2005. Biodegradability studies of certain wood preservatives in groundwater as determined by the respirometric BOD Oxitop Method. *Water, Air, and Soil Pollution* (165): 313–324.
- **VALLEJO, V.** 2004. Evaluación de la bioestimulación (adición de nutrientes) en la biodegradación de TPHs en un suelo contaminado con petróleo. Trabajo de grado de Maestría de la Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- **VENOSA, A., ZHU, X., SUIDAN. y LEE, K.** 2001. Guidelines for the Bioremediation of Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. Environmental Protection Agency. Office of Research and Development. National Risk Management Research Laboratory. Land Remediation and Pollutions Control Division. 26 W. Martin Luther King Drive Cincinnati, OH 45268
- **WATANABLE, K., HINO, S., ONODERA, K., SHIN-ICHI, K. y TAKAHASHI, N.** 1996. Diversity in kinetics of bacterial phenol-oxygenating activity. *Fermentation Bioengineering* 81(6): 560-563.
- **WU, Y., CHIANG, C., LU, C.** 2004. Respirometric evaluation by graphical analysis for microbial systems. *Environmental Monitoring and Assessment* (92): 137-152.
- **YING, W., YE, T., BIN, H., HUA-BING, Z. y BAO, C.** 2007. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. strain PD12. *Journal of Environmental Sciences* (19): 222-225

ANEXO 1

- Medio de Cultivo Bushnell-Haas (García y Garzón, 2005)

	g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
CaCl ₂	0.02
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.005
K ₂ HPO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	1.0
NH ₄ NO ₃	1.0

Llevar a 1 litro de agua desionizada, ajustar pH a 7.0 ± 0.5 , homogenizar bien.
Esterilizar en autoclave a 121° C, 15 libras/ pulgada² por 15 minutos.

ANEXO 2

- Cálculos para ajustar la humedad en los microcosmos. La humedad se calcula sobre la base de suelo seco y se presenta por Pw (IGAC,1979; IGAC, 1995)

Pw= gramo de agua por 100 gramos de muestra

$$P_w = \frac{\text{g muestra húmeda} - \text{g muestra seca}}{\text{g muestra húmeda}} \times 100$$

Entonces,

g de muestra húmeda= 9.27459

g de muestra seca= 4.8174

$$P_w = \frac{9.27459\text{g} - 4.817\text{g}}{9.27459\text{g}} \times 100 = 48\%$$

ANEXO 3

- Cálculos para obtener una concentración de ~ 250mg de fenol/ Kg de suelo en cada microcosmo

$$\frac{250\text{mg Fenol}}{\text{kg suelo}} \times \frac{1\text{Kg}}{1000\text{g}} \times 85\text{g suelo} = 21.25 \text{ mg Fenol}$$

Se pesó en balanza analítica en una cabina de extracción y se depositaron en tubos de ensayo.

ANEXO 4

- Cálculos para determinar las cantidades de C:N:P (100:10:1), teniendo como fuente de carbono el fenol 100 %

$$\frac{250 \text{ mg Fenol}}{\text{kg suelo}} \times \frac{10}{100} = \frac{25 \text{ mg N}}{\text{kg suelo}}$$

$$\frac{250 \text{ mg Fenol}}{\text{kg suelo}} \times \frac{1}{100} = \frac{2.5 \text{ mg P}}{\text{kg suelo}}$$

- Cálculos para la adición de SIS, por microcosmo (relación C:N:P 100:10:1).

La cantidad de nitrógeno requerido para la proporción de C:N 100:10, en forma de NH_4NO_3 :

$$\frac{0.025 \text{ g N}_2}{\text{Kg suelo}} \times \frac{1 \text{ kg suelo}}{1000 \text{ g suelo}} \times \frac{80 \text{ g NH}_4\text{NO}_3}{28 \text{ g N}_2} \times 85 \text{ g microcosmo} = 0.0061 \text{ g NH}_4\text{NO}_3$$

La cantidad de fósforo requerido para la proporción de C:P 100:1, en forma de K_2HPO_4 :

$$\frac{0.0025 \text{ g P}}{\text{Kg suelo}} \times \frac{1 \text{ kg suelo}}{1000 \text{ g suelo}} \times \frac{174,2 \text{ g K}_2\text{HPO}_4}{31 \text{ g P}} \times 85 \text{ g microcosmo} = 0.0012 \text{ g K}_2\text{HPO}_4$$

Homogenizar las sales antes de adicionar en los microcosmos.

ANEXO 5

- Cálculos para determinar la concentración de CO₂ (Acosta, 2008)

Ley de los gases ideales: $PV = nRT$, donde

P= presión.

V= volumen.

n= número de moles

R= constante de los gases.

T= temperatura.

Despejando el número de moles se obtiene:

$$n = \frac{P \times V}{R \times T}$$

- Cálculos para la elaboración de estándares de la curva patrón de CO₂ en (mg/l), para el primer montaje.

a. Datos iniciales para la mezcla de N₂: CO₂ (80:20).

Presión atmosférica= 0.744736

Temperatura (K)= 295.15

$$R \left(\frac{atm \times l}{mol \times K} \right) = 0.082$$

Volumen del Recipiente (l)= 0.11

% v/v de CO₂= 0.2

Peso Molecular CO₂= 44

b. moles iniciales de N₂ y CO₂, de la mezcla de N₂: CO₂ (80:20).

$$V_{\text{CO}_2} = 0.022$$

$$\text{Moles (n) totales} = 0.003384$$

$$n_{\text{iniciales de CO}_2} = 0.00067697$$

$$n_{\text{iniciales de N}_2} = 0.00270788$$

c. Preparación de estándares, con la mezcla de N₂: CO₂ (80:20).

Estándar (botellas)	Volumen removido (ml)
1	0
2	5
3	10
4	15
5	20
6	30

d. Muestra de cálculo para el estándar 2, con un volumen de remoción de 5 ml

$$P_{\text{recipiente}} = \left(\frac{P_{\text{inicial}} (\text{atm}) \times V_{\text{recipiente}} (\text{l})}{V_{\text{recipiente}} (\text{l}) + V_{\text{removido}} (\text{l})} \right)$$

$$n_{CO_2} = \left(\frac{P_{\text{recipiente}} \times V_{\text{removido}}}{R \times T} \right) \times 0.2$$

$$P_{\text{recipiente}} = \left(\frac{0.74473684 \text{ atm} \times 0.11 \text{ l}}{0.11 \text{ l} + 0.005 \text{ l}} \right) = 0.7124 \text{ atm}$$

$$n_{CO_2} = \left(\frac{0.7124 \text{ atm} \times 0.005 \text{ l}}{0.082 \left(\frac{\text{atm} \times \text{l}}{\text{mol} \times \text{K}} \right) \times 295.15 \text{ K}} \right) = 0.0001472 \text{ mol } CO_2$$

Como el 20% del gas es CO_2 , las moles removidas hay que multiplicarlas por 0.2. En la muestra de cálculos se obtiene 0.00009433

Luego se resta los moles removidos de los totales, para saber cuanto permanecen.

Moles que permanecen de CO_2 = moles totales de CO_2 – moles removidas de CO_2

Moles que permanecen de CO_2 = 0.00067697 moles- 2.9433×10^{-5}

$$\frac{\text{mg}}{\text{l}} CO_2 = \left(\frac{n_{CO_2} \times PM_{CO_2} \times 1000}{V_{\text{recipiente}}} \right) \Rightarrow \frac{\text{mg}}{\text{l}} CO_2 = \frac{0.0006475 \text{ mol} \times 44 \text{ g} \times 1000 \text{ mg}}{0.11 \text{ l}} = 259.014285 \frac{\text{mg}}{\text{l}} CO_2$$

e. Datos de los cálculos y las concentraciones de los estándares de CO_2 (mg/l).

Estándar	Volumen removido	P (atm)	moles removidos		moles finales recipiente (110 ml)	
			Totales	CO_2	n CO_2	mg/l CO_2
1	0	0,7447	0	0	0,000676969	270,78
2	0,005	0,7124	0,00014717	2,9433E-05	0,000647536	259,01
3	0,01	0,6827	0,00028207	5,6414E-05	0,000620555	248,22
4	0,015	0,6554	0,00040618	8,1236E-05	0,000595733	238,29
5	0,02	0,6302	0,00052075	0,00010415	0,00057282	229,12
6	0,03	0,5852	0,00072532	0,00014506	0,000531904	212,76

f. Elaboración de estándares de N₂ (puro) e inyección de mezcla de CO₂

Se prepararon dos estándares, los cálculos para el estándar con inyección de 5 ml de mezcla de N₂:CO₂ (80:20):

$$n_{\text{CO}_2} = \frac{0.0051 \times 0.71235698 \text{ atm} \times 0.2}{0.082 \text{ atm l mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \times 295.15 \text{ K}} = 0.0000294 \text{ moles CO}_2$$

$$\frac{\text{mg}}{1} \text{ CO}_2 = \frac{0.0000284 \text{ mol} \times 44 \text{ g} \times 1000 \text{ mg}}{0.11 \text{ l}} = 11.7674 \frac{\text{mg}}{1} \text{ CO}_2$$

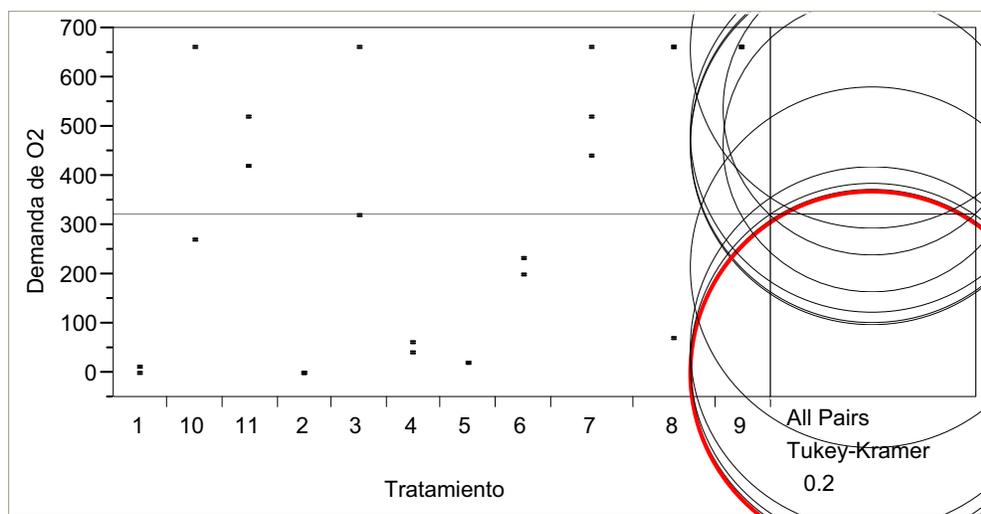
g. Datos de los cálculos y las concentraciones de los estándares de N₂ con inyección de CO₂ (mg/l).

			Moles iniciales		Moles finales recipiente 110 ml	
	Volumen mezcla	Presión (atm)	N ₂	CO ₂	CO ₂	mg/l
N2+5mlmezcla	0,005	0,712	0,00270788	0	2,94187E-05	11,76747664
N2+15ml mezcla	0,015	0,655	0,00270788	0	8,11906E-05	32,47625226

Este procedimiento se repitió para la elaboración de la curva patrón del segundo montaje.

ANEXO7

- **Análisis estadístico del consumo de O₂ por tratamiento (Tukey Kramer)**



- **Comparación de Medias**

Dif= medias	184	102	110	112	170	181	99	118	122	94	113
184	0.00	120.67	170.50	191.00	195.50	197.00	446.00	611.00	641.00	656.00	661.00
102	-120.67	0.00	49.83	70.33	74.83	76.33	325.33	490.33	520.33	535.33	540.33
110	-170.50	-49.83	0.00	20.50	25.00	26.50	275.50	440.50	470.50	485.50	490.50
112	-191.00	-70.33	-20.50	0.00	4.50	6.00	255.00	420.00	450.00	465.00	470.00
170	-195.50	-74.83	-25.00	-4.50	0.00	1.50	250.50	415.50	445.50	460.50	465.50
181	-197.00	-76.33	-26.50	-6.00	-1.50	0.00	249.00	414.00	444.00	459.00	464.00
99	-446.00	-325.33	-275.50	-255.00	-250.50	-249.00	0.00	165.00	195.00	210.00	215.00
118	-611.00	-490.33	-440.50	-420.00	-415.50	-414.00	-165.00	0.00	30.00	45.00	50.00
122	-641.00	-520.33	-470.50	-450.00	-445.50	-444.00	-195.00	-30.00	0.00	15.00	20.00
94	-656.00	-535.33	-485.50	-465.00	-460.50	-459.00	-210.00	-45.00	-15.00	0.00	5.00
113	-661.00	-540.33	-490.50	-470.00	-465.50	-464.00	-215.00	-50.00	-20.00	-5.00	0.00

$\alpha=0.20$

- Comparación usando Tukey-Kramer HSD

q*
2.96927

Abs(Dif)-LSD	184	102	110	11	10	181	99	118	122	94	113
184	-519.66	-353.71	-349.16	-328.66	-324.16	-277.38	-73.66	91.34	121.34	136.34	141.34
102	-353.71	-424.30	-424.55	-404.05	-399.55	-347.96	-149.05	15.95	45.95	60.95	65.95
110	-349.16	-424.55	-519.66	-499.16	-494.66	-447.88	-244.16	-79.16	-49.16	-34.16	-29.16
112	-328.66	-404.05	-499.16	-519.66	-515.16	-468.38	-264.66	-99.66	-69.66	-54.66	-49.66
170	-324.16	-399.55	-494.66	-515.16	-519.66	-472.88	-269.16	-104.16	-74.16	-59.16	-54.16
181	-277.38	-347.96	-447.88	-468.38	-472.88	-424.30	-225.38	-60.38	-30.38	-15.38	-10.38
99	-73.66	-149.05	-244.16	-264.66	-269.16	-225.38	-519.66	-354.66	-324.66	-309.66	-304.66
118	91.34	15.95	-79.16	-99.66	-104.16	-60.38	-354.66	-519.66	-489.66	-474.66	-469.66
122	121.34	45.95	-49.16	-69.66	-74.16	-30.38	-324.66	-489.66	-519.66	-504.66	-499.66
94	136.34	60.95	-34.16	-54.66	-59.16	-15.38	-309.66	-474.66	-504.66	-519.66	-514.66
113	141.34	65.95	-29.16	-49.66	-54.16	-10.38	-304.66	-469.66	-499.66	-514.66	-519.66

Valores positivos muestran la diferencia significativa entre las medias.

ANEXO8

- Datos crudos de la producción de CO₂ (mg/l) en la biodegradación del fenol, cromatografo de gases con un n=4.

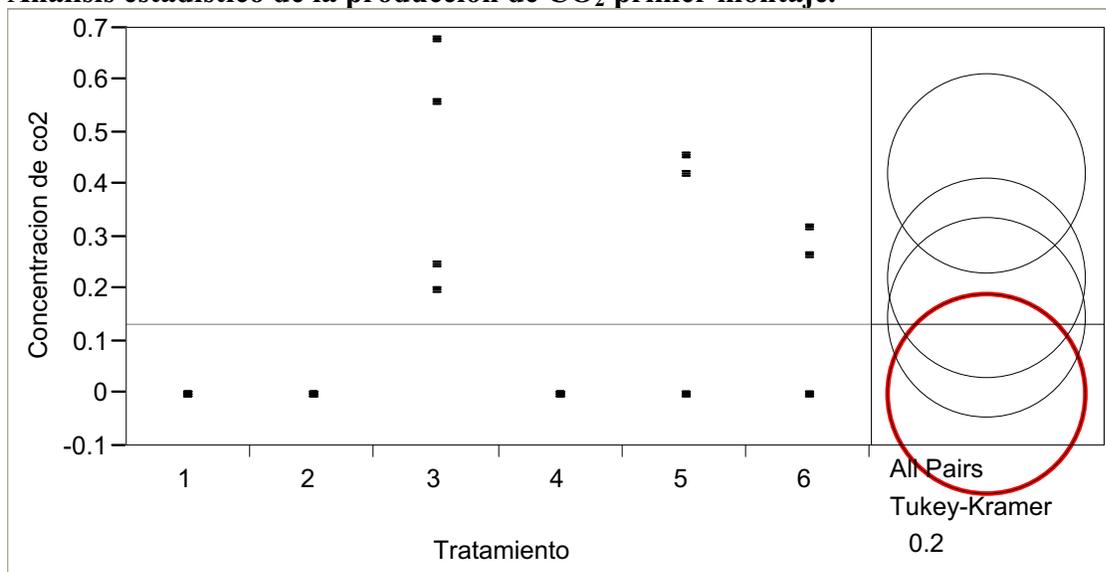
Ttos/Días	0	3	9	12
94	0	0	18.35085	22.08941
	0	0	17.74266	20.91385
	0	0	18.19635	18.58061
	0	0	17.85459	18.33
113	0	0	23.33359	29.75977
	0	0	19.94679	26.97852
	0	0	24.14032	32.09429
	0	0	20.70194	29.32358
110	0	17.87237	27.80938	48.34332
	0	17.31314	29.30701	75.37453
	0	17.67929	29.23146	51.85114
	0	17.19542	29.67069	84.2818
118	0	0	19.43377	20.98514
	0	0	20.43823	18.27432
	0	0	19.68045	24.60679
	0	0	20.8411	19.68685

Ttos/Días	0	3	9	12
122	0	0	20.30904	65.15167
	0	0	20.47511	67.64315
	0	0	19.60405	20.91385
	0	0	19.44855	20.84021
99	0	16.63285	28.34222	53.25584
	0	16.47574	28.6752	57.19057
	0	17.52801	28.84892	18.27831
	0	17.2516	28.49036	17.05622
102	0	0	128.86123	253.87718
	0	0	164.52505	323.32173
	0	0	114.13151	282.12319
	0	0	119.90128	293.94365
181	0	0	242.82641	328.1426
	0	0	306.13313	326.94423
	0	0	189.76744	294.78861
	0	0	246,242388	329.43575
184	0	0	37,83357	270.9418
	0	0	57.0226	242.455
	0	0	56.76428	237.22762
	0	0	62.06354	257.7915

Ttos/Días	0	3	9	12
170	0	0	26.48663	284.29065
	0	0	329.7804	312.15469
	0	0	331.09731	294.59433
	0	0	329.78804	256.02887
112	0	0	216.3012	219.56509
	0	0	213.63495	204.63394
	0	0	327.11154	201.25168
	0	0	226.71733	222.40678

ANEXO9

- **Análisis estadístico de la producción de CO₂ primer montaje.**



Comparación de medias

Dif=Medias	110	122	99	94	118	113
110	0.00000	0.20136	0.27585	0.42185	0.42185	0.42185
122	-0.20136	0.00000	0.07449	0.22049	0.22049	0.22049
99	-0.27585	-0.07449	0.00000	0.14600	0.14600	0.14600
94	-0.42185	-0.22049	-0.14600	0.00000	0.00000	0.00000
118	-0.42185	-0.22049	-0.14600	0.00000	0.00000	0.00000
113	-0.42185	-0.22049	-0.14600	0.00000	0.00000	0.00000

$\alpha=0.20$

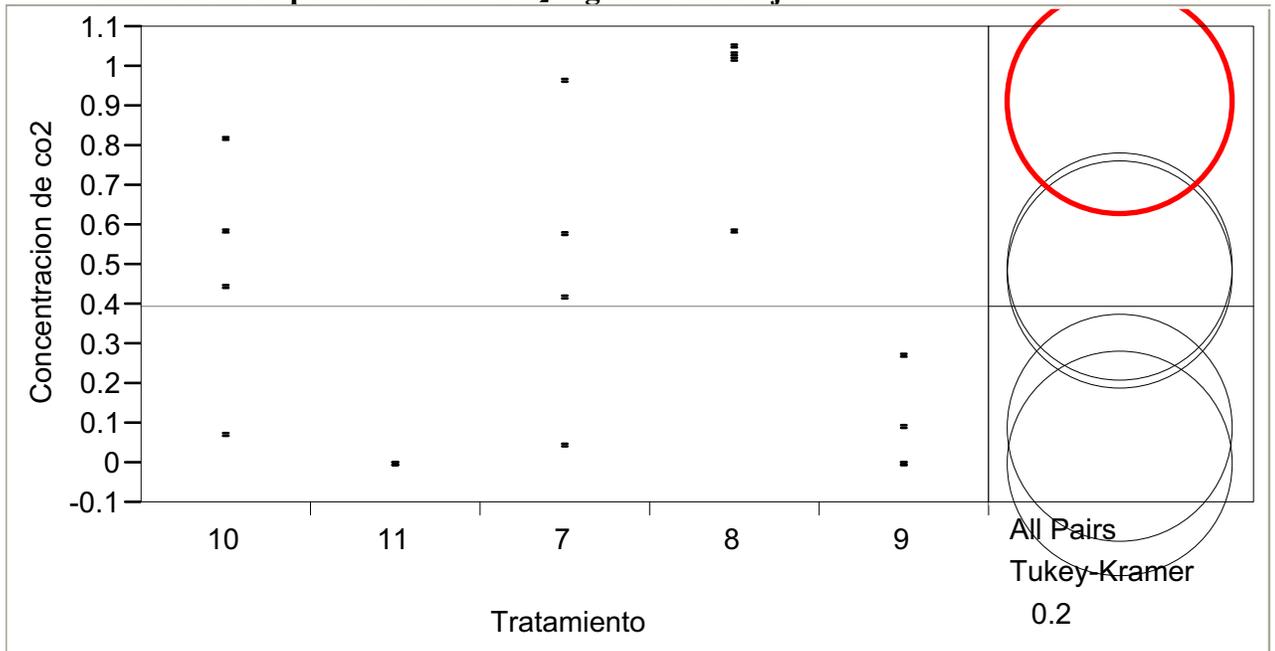
Comparación usando Tukey-Kramer HSD

q*
2.42323

Abs(Dif)-LSD	110	122	99	94	118	113
110	-0.27000	-0.06864	0.00585	0.15185	0.15185	0.15185
122	-0.06864	-0.27000	-0.19551	-0.04951	-0.04951	-0.04951
99	0.00585	-0.19551	-0.27000	-0.12401	-0.12401	-0.12401
94	0.15185	-0.04951	-0.12401	-0.27000	-0.27000	-0.27000
118	0.15185	-0.04951	-0.12401	-0.27000	-0.27000	-0.27000
113	0.15185	-0.04951	-0.12401	-0.27000	-0.27000	-0.27000

Valores positivos muestran la diferencia significativa entre las medias.

• **Análisis de la producción de CO₂ segundo montaje.**



Comparación de medias

Dif=Medias	181	102	170	184	112
181	0.00000	0.42015	0.44081	0.82944	0.91939
102	-0.42015	0.00000	0.02066	0.40929	0.49924
170	-0.44081	-0.02066	0.00000	0.38863	0.47859
184	-0.82944	-0.40929	-0.38863	0.00000	0.08996
112	-0.91939	-0.49924	-0.47859	-0.08996	0.00000

$\alpha = 0.20$

Comparación usando Tukey-Kramer HSD

q*
2.29490

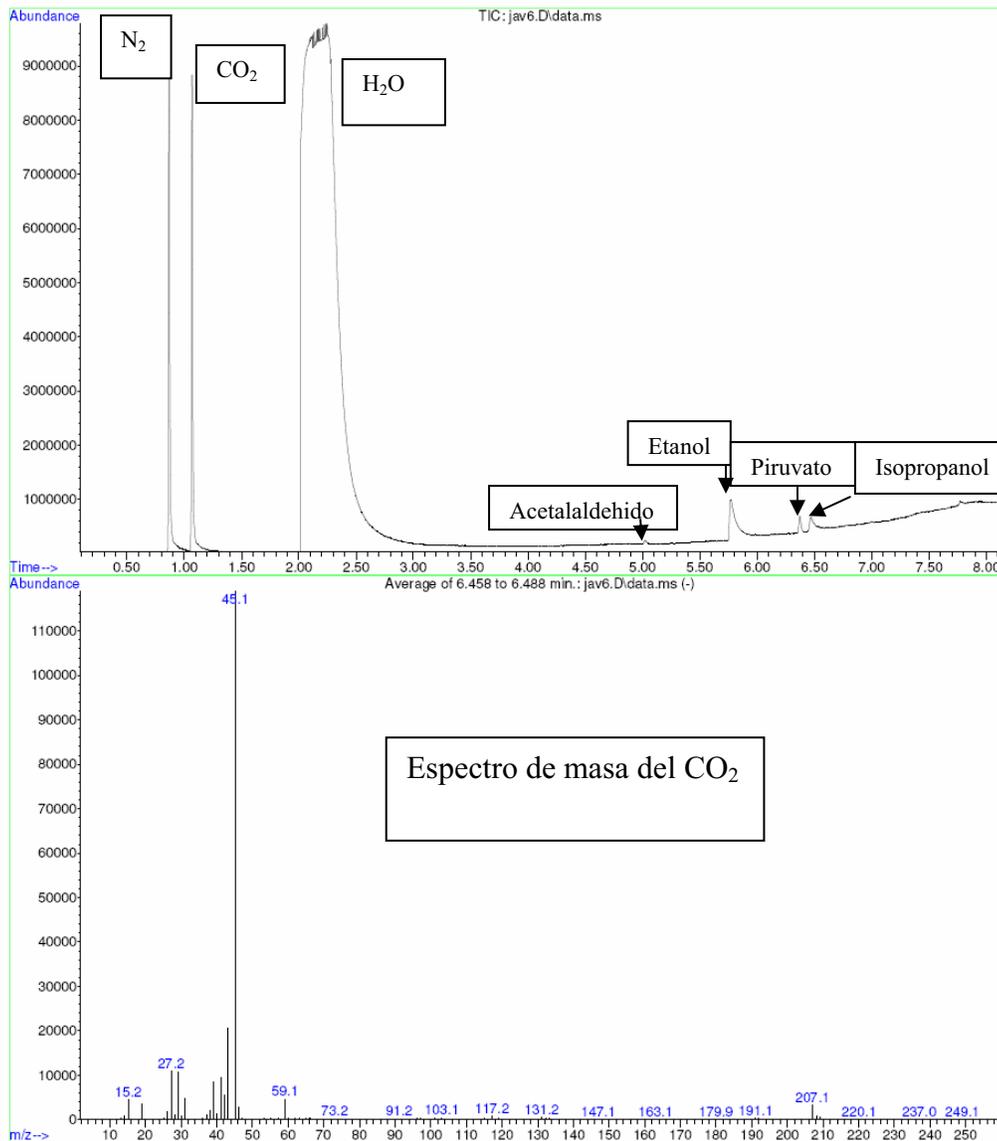
Abs(Dif)-LSD	181	102	170	184	112
181	-0.40462	0.01553	0.03619	0.42482	0.51477
102	0.01553	-0.40462	-0.38396	0.00467	0.09462
170	0.03619	-0.38396	-0.40462	-0.01599	0.07397
184	0.42482	0.00467	-0.01599	-0.40462	-0.31466
112	0.51477	0.09462	0.07397	-0.31466	-0.40462

Valores positivos muestran la diferencia significativa entre las medias.

ANEXO 10

- Espectro de masas de la degradación del fenol por la cepa PUJ-M-Bio-USBA 181, al día 15 del estudio.

File :F:\jav6.D
Operator : A. REYES
Acquired : 12 May 2008 18:51 using AcqMethod CO2.M
Instrument : 6890 Plus - 5973N
Sample Name: jav6
Misc Info :
Vial Number: 2



Equipo= Agilent, Tiempo de corrida= 15 min. Muestras con Head Space.