

19
2 es.



POR MI DEBE
REGLAR
EL OSPIRITC

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN CULTIVO
MIXTO BACTERIANO CAPAZ DE DEGRADAR BIFENILOS
POLICLORADOS IN VITRO.

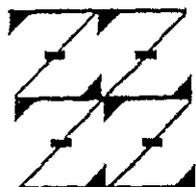
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

MONICA JAZMIN HERNANDEZ GAYOSSO

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. MIGUEL CASTILLO G.

ASESOR: Q.B.P. JUAN A. ZERMEÑO EGUIA LIS.



MEXICO, D.F.

1998.

LO DONADO
1988
TESIS
FALLA DE ORIGEN

255297



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Area de Normatividad y Sustentabilidad Ambiental perteneciente a la Subdirección de Protección Ambiental del Instituto Mexicano del Petróleo.

AGRADECIMIENTOS.

Al Instituto Mexicano del Petróleo, por las facilidades brindadas para el uso de sus instalaciones y a las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo.

A la Ing. Marilú Fernández González por su cooperación durante la fase de determinaciones analíticas del presente trabajo.

Al Dr. Isaías Salgado Ugarte y al Biól. Alejandro Córdoba Cárdenas por su asesoría para el manejo estadístico de resultados.

Al M. en C. Miguel Castillo González, mi Director de Tesis por su apoyo académico.

Al Q.B.P. Juan Antonio Zermeño Eguía Lis por su valiosa asesoría e impulso para incursionar en las áreas de microbiología y biorremediación.

A los Profesores Quím. María Teresa Mendoza Mata, Q.B.P. Francisco Alvarado Pérez y M. en C. Eliseo Cantellano de Rosas, por sus valiosas observaciones y correcciones realizadas a este trabajo.

Dedico este trabajo:

A mis Padres, Pilar y José Luis, por haberme rodeado en todo momento de cariño y comprensión, por su apoyo, por haberme dado esta familia y por ser el mejor ejemplo de superación y tenacidad. Los quiero mucho.

A Blan, por su amor incondicional, por su compañía, y por ser una persona tan importante en mi vida. Tu haces mejor mi existencia.

A Pepe, por llenar mi vida de música y por sus afectuosas bienvenidas. Te quiero.

A Rayo, por toda una niñez compartida y el gran amor que le tengo. Nunca te alejes.

A Orlando, por compartir su vida conmigo y despertarme siempre con un beso. Te amo.

A las ballenas, que cada día son un poco menos felices debido a la contaminación por Bifenilos Policlorados.

*ES TIEMPO DE COMPROMISOS.
HAY QUE SOLUCIONAR LOS
PROBLEMAS, NO SOLO
DESCRIBIRLOS.*

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCION.....	2
III. OBJETIVOS.....	4
IV. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	5
V. ANTECEDENTES.....	6
V.1 Propiedades de los Bifenilos Policlorados.....	6
V.2 Entrada de los Bifenilos Policlorados en el Ambiente y su Biomagnificación.....	9
V.3 Toxicidad.....	11
V.4 Biodegradación de Bifenilos Policlorados.....	12
VI. MATERIAL Y METODOS.....	17
VI.1 Aislamiento y Selección del Cultivo Mixto.....	17
VI.2 Aclimatación del Cultivo Mixto Aislado a Bifenilo.....	18
VI.3 Aclimatación del Cultivo Mixto a una Mezcla de Bifenilos Policlorados.....	19
VI.3.1 Incorporación del Surfactante Biotrix al Sistema.....	19
VI.4 Medición de la Degradación de Bifenilos Policlorados Después de Ser Sometidos al Cultivo.....	20
VI.4.1 Extracción de Bifenilos Policlorados de los Medios de Cultivo y Purificación de los Extractos.....	21
VI.4.2 Cuantificación de Bifenilos Policlorados en las Muestras Resultantes.....	22
VI.5 Aislamiento e Identificación de Cepas Bacterianas Presentes en el Cultivo Mixto.....	22
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
VIII. CONCLUSIONES.....	41
IX. BIBLIOGRAFIA.....	42
ANEXO I.....	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. NOMBRES COMERCIALES DE BIFENILOS POLICLORADOS	8
Tabla 2. COMPOSICION APROXIMADA DE LOS AROCLOR	9
Tabla 3. CONCENTRACION DE BPC's PRESENTES EN DIFERENTES ORGANISMOS	10
Tabla 4. GENEROS Y ESPECIES BACTERIANAS REPORTADOS COMO DEGRADADORES DE BPC's.....	13
Tabla 5. EFECTO DE LA UTILIZACION DE DIFERENTES SUSTANCIAS EN LA DEGRADACION DE BPC's.	15
Tabla 6. MEDIO MINERAL DMA.....	18
Tabla 7 AGAR NUTRITIVO	18
Tabla 8. FUENTE DE CARBONO UTILIZADA PARA TRES CINETICAS DE CRECIMIENTO SIMULTANEAS.....	19
Tabla 9 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR LA DEGRADACION DE BPC's POR EL CULTIVO MIXTO.....	20
Tabla 10. AGAR DE SOYA TRIPTICASENA (TSA)	22
Tabla 11 SISTEMA DE IDENTIFICACION PARA ENTEROBACTERIACEAE Y OTROS BACILOS GRAM (-) API 20 E	23
Tabla 12. SISTEMA DE IDENTIFICACION PARA BACILOS GRAM (-) NO ENTEROBACTERIACEAE API 20 NE	24
Tabla 13. MEDIO DE CONSERVACION.....	25
Tabla 14. VALORES OBTENIDOS POR EL ANALISIS DE CROMATOGRAFIA DE GASES DE LAS MUESTRAS PROCESADAS	30
Tabla 15. PORCENTAJES DE BIODEGRADACION DE BPC's OBTENIDOS AL UTILIZAR AL BIFENILO COMO COSUBSTRATO	34
Tabla 16 COMPOSICION DEL AROCLOR 1260.....	35
Tabla 17 MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DEL CULTIVO.....	36
Tabla 18. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DEL SISTEMA DE IDENTIFICACION API 20 E	38
Tabla 19. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DEL SISTEMA DE IDENTIFICACION API 20 NE	39
Tabla 20. PRUEBAS BIOQUIMICAS COMPLEMENTARIAS PARA LA IDENTIFICACION DE GENEROS BACTERIANOS	40

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. CINETICA DE CRECIMIENTO 1, UTILIZANDO BIFENILO AL 1%...	26
Gráfica 2. CINETICA DE CRECIMIENTO 2, UTILIZANDO BIFENILO AL 1%...	27
Gráfica 3. CINETICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO MIXTO SELECCIONADO EN ACEITE DE TRANSFORMADOR (BPC'S) AL 0.02%.....	27
Gráfica 4. CINETICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO MIXTO SELECCIONADO EN AROCLOR 1260(400 ppm)	28
Gráfica 5. CINETICAS DE CRECIMIENTO PARA LA EVALUACION DEL SURFACTANTE BIOTRIX.....	29
Gráfica 6. VARIACION ENTRE LOS VALORES TESTIGO Y LOS VALORES OBTENIDOS DE LOS TRATAMIENTOS.....	31
Gráfica 7. DIFERENCIA DE LA DISMINUCION DE BPC'S ENTRE TRATAMIENTOS.....	32
Gráfica 8. PORCENTAJES PROMEDIO DE DEGRADACION DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.....	33

I. RESUMEN.

Se aisló un cultivo mixto bacteriano capaz de degradar Aroclor 1260, a partir de un suelo que ha sufrido la incorporación de aceite dieléctrico debido a consecutivos derrames de un transformador. El aislamiento fue realizado con la utilización de bifenilo como fuente de carbono. Se evaluó el poder degradativo del cultivo aislado, mediante la medición de una concentración inicial conocida y la concentración final de Aroclor 1260 después de la acción bacteriana. Así mismo fueron evaluados el papel en la degradación del bifenilo como promotor de cometabolismo y la influencia de la incorporación del surfactante Biotrix. El análisis cromatográfico reveló que el cultivo mixto por sí mismo es capaz de degradar el 10% de la mezcla de BPC's y que la adición de bifenilo o de Biotrix incrementan en buena medida la biodegradación, obteniéndose hasta un 57% de eliminación de dicha sustancia, con la utilización de este último. Una vez conociendo la cualidades de este cultivo, fueron aisladas las cepas que lo forman para posteriormente ser identificadas de acuerdo con el sistema API 20 NE y API 20 E como: *Flavobacterium indologenes*, *Alcaligenes sp*, *Pseudomonas sp 1* y *Pseudomonas sp 2*

II. INTRODUCCION.

La explotación humana de combustible fósil y la producción de novedosos compuestos sintéticos (xenobióticos) en este siglo, ha originado la introducción al ambiente de numerosas sustancias, muchas de las cuales resultan tóxicas para los sistemas vivos y su presencia en hábitats terrestres y acuáticos a menudo acarrea serias consecuencias ecológicas que son agudizadas cuando la actividad de biodegradación microbiana es limitada. Tal es el caso de los bifenilos policlorados (BPC's) que son parte de los compuestos organoclorados más abundantemente distribuidos en el ambiente, junto con el DDT 2,2-bis(P-clorofenil)1,1,1-tricloroetano (Furukawa, 1982).

Los bifenilos policlorados son una familia de compuestos comerciales producidos por la cloración directa de bifenilo, los cuales están constituidos por dos anillos unidos de 6 carbonos cada uno, en donde se sustituyen átomos de hidrógeno por cloro. Inicialmente fueron producidos por la Swann Chemical Company en el año de 1929. Y es al siguiente año que se inicia la producción masiva de bifenilos policlorados puros por la compañía Monsanto (Departament of Health and Human Services, 1996).

La excelente estabilidad térmica, química y biológica, además de su capacidad dieléctrica son propiedades que impulsaron la entrada de estas sustancias a la industria (Hutzinger *et al.*, 1974), donde fueron utilizadas principalmente en aceite de transformador, capacitores dieléctricos y lubricantes en sistemas hidráulicos, entre otros (Abramowicz, 1990).

Es hasta el año de 1966 cuando son reportadas en Suecia las primeras evidencias de bifenilos policlorados en el ambiente (Jensen, 1966) y posteriormente en países europeos, Norteamérica y Japón. Tales hechos originaron gran preocupación en torno a estas sustancias y sobre todo al tener conocimiento de algunos accidentes como el "Jusho Oil Disease", donde más de 1500 personas fueron intoxicadas al consumir arroz contaminado con bifenilos policlorados (Organización Panamericana de la Salud, 1979; SEMARNAP, 1995).

Ante tales consecuencias se suspendió la producción de estos compuestos en Estados Unidos de América, países europeos y Japón, entre los años de 1970 a 1973. No obstante cantidades significativas siguieron siendo introducidas al ambiente.

En 1976 el Congreso de Estados Unidos de América promulga el Acta para el Control de Sustancias Tóxicas, dirigida por la EPA para el control de la manufactura, proceso, distribución, uso, disposición y etiquetado de bifenilos policlorados. Es en 1978 cuando se prohíbe en general el uso de dichas sustancias en Estados Unidos, tiempo en el cual México realiza la mayor importación de bifenilos policlorados.

A nivel mundial se estima que desde 1929 se han producido 2 millones de toneladas, donde cerca de la mitad son de procedencia norteamericana. En el caso de México se desconoce la

cantidad real de bifenilos policlorados existentes, pero se ha manejado la cifra de 12,400 toneladas, de acuerdo a información obtenida de los principales generadores: Luz y Fuerza del Centro, Comisión Federal de Electricidad, Petróleos Mexicanos, Sistema de Transporte Colectivo Metro, Ferrocarriles Nacionales de México y las principales industrias del país. A la fecha se tienen inventarios de empresas generadoras o poseedoras de estas sustancias tanto del sector público como del privado, por una cantidad estimada de 6,400 toneladas de las cuales corresponden 5,000 toneladas al sector público y 1,400 al sector privado (SEMARNAP, 1995).

Desde su aparición en la industria a la fecha, se sabe que cientos de millones de kilos han sido liberados al ambiente (Furukawa, 1982) incorporándose en la cadena alimentaria. La contaminación por bifenilos policlorados es tal, que han sido encontrados en aguas residuales, productos para el hogar, agua para beber y alimentos, principalmente en productos pesqueros. Además se ha encontrado en el tejido adiposo humano, constituyéndose en un riesgo para la salud, dado que existen evidencias de que puede ocasionar diferentes trastornos, desde cloracné hasta efectos mutagénicos y/o carcinogénicos (Furukawa, 1982).

Ante tal problemática no se hizo esperar el desarrollo tecnológico, implementándose a nivel mundial diferentes tecnologías para su destrucción, entre las que se encuentran la incineración, dechloración, extracción catalítica, arco de plasma, reactor de fase gaseosa y horno de microondas (Woodyard *et al*, 1989; SEMARNAP, 1995). De éstas la mayormente utilizada es la incineración, ya que proporciona una destrucción de un 99.9999%, sin embargo se corre el riesgo de producir dioxinas y furanos antes de ser destruidos los propios bifenilos policlorados. Por otra parte estas tecnologías, debido a sus características resultan inoperables cuando se trata de realizar la reversibilidad a medios naturales.

Tomando como base la cualidad que tiene el ambiente de autodepuración, teóricamente resulta factible la eliminación de los bifenilos policlorados por acción microbiana, desafortunadamente, los datos arrojados por la experimentación de científicos del mundo, reflejan una pobre degradación y la persistencia de isómeros altamente clorados (Chaudhry, 1994).

La solución a este problema reside entonces, en la búsqueda de nuevas especies microbianas que sean capaces de una degradación rápida y completa de bifenilos policlorados en ambientes naturales. Estas especies necesitan ser capaces de establecerse y persistir en el ambiente hasta que el total de estos compuestos sea degradado (Hooper, 1990).

III. OBJETIVOS.

- I. Aislar un cultivo mixto que presente actividad degradativa de bifenilos policlorados.
- II. Evaluar la actividad degradadora del cultivo mixto a partir de la cuantificación de una concentración inicial conocida y su concentración final, después de ser sometida al cultivo.
- III. Determinar la influencia del bifenilo, como promotor de cometabolismo para aumentar la biodegradación de bifenilos policlorados.
- IV. Determinar la influencia del surfactante Biotrix sobre la degradación de bifenilos policlorados
- V. Aislar y caracterizar las cepas formadoras del cultivo mixto (genero).

IV. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Al aplicar un cultivo bacteriano mixto, que ha estado expuesto a BPC's, sobre una mezcla de Aroclor 1260, se tendrá un efecto de disminución de estos compuestos.

V. ANTECEDENTES.

V.1 Propiedades de los Bifenilos Policlorados.

Los bifenilos policlorados (BPC's) son una familia de compuestos producidos comercialmente por la cloración directa de bifenilo usando cloruro férrico y yodo como catalizador. La molécula de bifenilo está compuesta de dos anillos de seis átomos de carbono conectados entre sí (Figura 1), un bifenilo policlorado es cualquier molécula que tenga uno o más cloros unidos al núcleo de bifenilo (Figura 1).

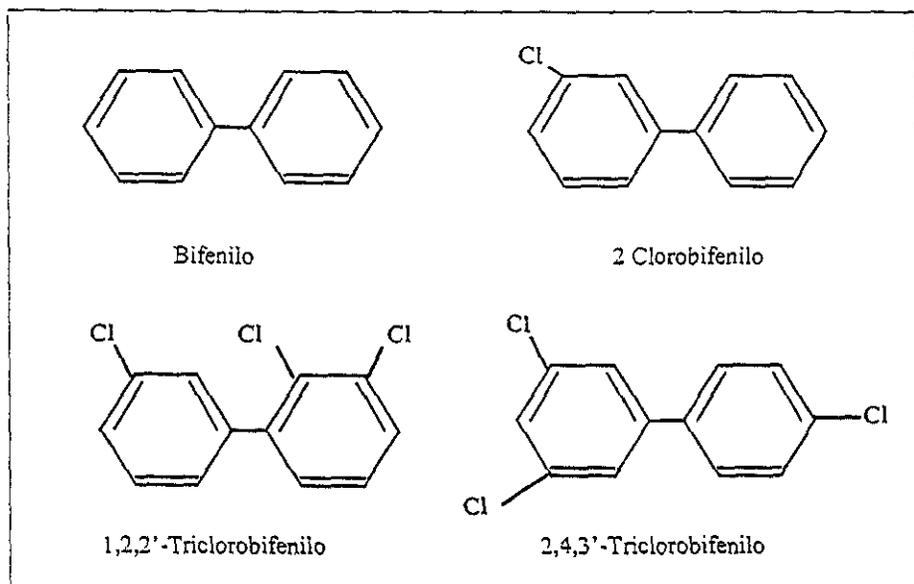


Figura 1. Estructura del bifenilo y diversos bifenilos policlorados.

Los cloros pueden estar colocados en uno o en los 10 sitios disponibles, existiendo 209 diferentes combinaciones teóricamente posibles, pero sólo cerca de la mitad son producidas debido al impedimento estérico.

Los BPC's fueron producidos y vendidos como mezclas complejas difiriendo en su nivel de cloración. Las mezclas crudas resultantes de la cloración eran destiladas fraccionadamente para producir mezclas comerciales con las propiedades deseadas. Los productos iban desde fluidos de aceite ligero hasta grasas y pastas dependiendo del nivel de cloración.

Los productores de BPC's vendieron los materiales bajo diferentes nombres comerciales (Tabla 1), entre estos pueden mencionarse: Aroclor (Monsanto, Estados Unidos), Phenoclor y Pyralene (Protelec, Francia), Clofthen (Fabenfabriken Bayer A. G., Alemania) y Kanecior (Kanegafuchi Chemical Industrial, Japón).

Los fabricantes también asignaban números a los productos que usualmente reflejaban el grado de cloración. Por ejemplo Aroclor 12 42 (Tabla 2), con 12 átomos de carbono y 42% de cloro; Clophen A30, con 3 cloros por bifenilo; y Kanecior 300, con 3 Cloros por bifenilo.

Entre las propiedades físicas más notables de los BPC's se encuentran: baja presión de vapor, baja solubilidad en agua, excelentes propiedades dieléctricas, resistencia a la flama, además de que son muy versátiles debido a que su estado físico va desde líquidos, cristales y resinas. Sus propiedades químicas incluyen: resistencia a la oxidación y una relativa inercia (Abramowicz, 1990).

Como resultado de estas propiedades, los BPC's han sido aplicados en una extensa variedad de usos en transformadores y condensadores como dieléctricos, fluidos transmisores de calor, fluidos hidráulicos y componentes en revestimientos interiores de frenos. También se utilizaron en la fabricación de adhesivos, ceras de pisos, selladores, formulación de aceites lubricantes, barnices, adelgazantes de solventes y tintas de imprenta, así como plastificadores, papel copia, plaguicidas y en la producción de pinturas marinas alguicidas y molusquicidas (Hutzinger, 1974; Organización Panamericana de la Salud, 1979; Departamento de Salud de Nueva Zelandia, 1989; SEMANARP, 1995).

Para disminuir su viscosidad fueron mezclados con solventes como el triclorobenceno o tetraclorobenceno y se les llamó genéricamente ASKAREL (NO ARDE). una vez mezclados se utilizaron como refrigerantes.

En Estados Unidos se han determinado los siguientes porcentajes de la manera en que se han empleado los BPC's (SEMARNAP, 1995):

- | | |
|--------------------|-----|
| • Capacitores | 50% |
| • Transformadores | 26% |
| • Plastificantes | 9% |
| • Lubricantes | 6% |
| • Papel copia | 4% |
| • Intercambiadores | 3% |

Tabla 1. NOMBRES COMERCIALES DE BIFENILOS POLICLORADOS

BPC's	Fabricante	País
Abestol	American Corp.	Estados Unidos
Asbestol	Monsanto	Estados Unidos
Auxol		
Aceclor	ACEC	Bélgica
Aroclor 1221, 1232,	Monsanto	Estados Unidos
1248, 1254, 1260, 1268, 1270,	PR Mattory and Company	Estados Unidos
1342, 2565, 4465, 5460.		
Apirollo	Caffaro	Italia
Apirolia		
Bakola 131	Monsanto	Estados Unidos
Chlorextol	Allis Chalmers	
Chloroextol		
Clophen A30	Bayer	Alemania
Clophen A50		
Chlorintol	Sprayue Electric Co.	Estados Unidos
Dikanol	Cornell Dubille	Estados Unidos
DK	Caffaro	Italia
E(d)ucarel	Electrical Utilities Corp.	Estados Unidos
Electrophenyl	PCT	Francia
Ejaol	Bayer	Alemania
Elemex	McGraw Edison	Estados Unidos
Fencior 42, 54, 64, 70	Caffaro	Italia
Hyvol	Aerovox	Italia
Inerteen 300, 400, 600	Westinghouse	Estados Unidos
Kanechlor 200-600	Kanegafuji	Japón
Kennechlor	Kanegafuchi	Japón
No-Flamol	Wagner Electric	Estados Unidos
Phenoclar DP6	Baylor	Alemania
Phenoclar DP6	Prodelec	Francia
Pyroclor	Monsanto	Reino Unido
Pyroclor		
Pironal	General Electric	Estados Unidos
Pyralene 1460	Prodelec	Francia
Pyralene 1500, 1501		
Pyralene 3010,3011		
Pyralene T1		
Pyralene T2		
Pyralene T3		
Sant(h)osafe	Mitsubishi	Japón
Santosol		
Santowax		
Sant(h)otherm FR		
Sorol	So(l)vol	URSS
Sovol		
Terminol FR	Monsanto	Estados Unidos
Terpenychlore	PCT	Francia
Chlorphen	JardCorp	Estados Unidos
Clophen	Bayer	Alemania

Departamento de Salud de Nueva Zelanda, 1989.

Tabla 2. COMPOSICION APROXIMADA DE LOS AROCLOR

		Aroclor				
No. de átomos de Cl en la molécula	% de cloro (por peso)	1221	1242	1248	1254	1260
0	0	12.7				
1	18.8	47.1	3			
2	31.8	32.3	13	2		
3	41.3		28	18		
4	48.6		30	40	11	
5	54.4		22	36	49	12
6	59.0		4	4	34	38
7	62.8				6	41
8	66.0					8
9	68.8					1

Organización Panamericana de la Salud, 1979.

V.2 Entrada de los Bifenilos Policlorados en el Ambiente y su Biomagnificación.

La contaminación de BPC's en el ambiente se produce exclusivamente por la actividad humana. Por lo cual las concentraciones más altas de BPC's se encuentran en áreas industrializadas. Los BPC's son introducidos al ambiente principalmente por derrames de equipos, incineración de residuos, descarga industrial de lodos y desechos. Aunque un papel importante tiene la contaminación por el uso de artículos como: algunos aceites lubricantes para cuchillas, molusquicidas, alguicidas, plaguicidas, papel copia a presión, adhesivos, selladores y plásticos, ya que durante su empleo están en contacto directo con el medio, sin que haya modo de recuperarlos.

Los BPC's emitidos a la atmósfera son transportados por las nubes y se depositan en la superficie como precipitación. Factores como la temperatura del aire, velocidad del viento, frecuencia de tormentas, cantidad de lluvia y volatilidad de cada tipo de BPC's influye en su patrón y rango de movimiento en la atmósfera. Al parecer, se observa muy poca contaminación atmosférica de BPC's debido a que tiene una baja volatilidad, sin embargo, puede producirse una apreciable descarga en la atmósfera sobre todo de productos con una baja cloración.

Otra ruta de transporte de los BPC's es a través de los derrames recibidos en aguas continentales, que involucran al transporte bajo corriente por solución y adsorción dentro de partículas debido al movimiento de sedimentos, siendo el ambiente marino el contenedor final de estas sustancias (Whale, 1996).

En la década de los 70's, se reporta la presencia de BPC's en diferentes organismos (Tabla 3) la cual reflejaban una acumulación progresiva al ir ascendiendo en la cadena alimentaria. La bioacumulación es favorecida por las propiedades lipofílicas de los bifenilos policlorados. Es sabido que el ser humano al igual que los animales absorben estas sustancias a través de la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal. Una vez que estos químicos se han introducido al organismo son transportados a través del torrente del cuerpo al hígado y a varios músculos, el hígado es el órgano que actúa como un contenedor para estas moléculas extrañas. No obstante, debido a que son altamente solubles en grasas, se absorben mayormente por el tejido adiposo del cuerpo.

Tabla 3. CONCENTRACION DE BPC's PRESENTES EN DIFERENTES ORGANISMOS

Organismo	Concentración de BPC's por Kg de grasa
Zooplanton Marino	5 mg/Kg*
Arenques	10 mg/Kg*
Bacalao	10 mg/Kg*
Lucio	10 mg/Kg*
Gaviota plateada	650 mg/Kg*
Cormorán	420 mg/Kg*
Invertebrados marinos	0.1-0.2 mg/Kg**
Pato marino <i>Clangula hiemalis</i>	14 mg/Kg**
Babosas	0.01mg/Kg**
Serpientes	0.01 mg/Kg**
Hormigas	0.01 mg/Kg**
Liebre	0.22 mg/Kg**
Zorro	2.5 mg/Kg**
Aves insectívoras	1 mg/Kg**
Gavilán	70 mg/Kg**

*Jensen S, Renberg L, y Olsson M., 1972.

**Odsjo T., 1973.

En la industria, la absorción por la piel (ruta dérmica) es la mejor ruta de entrada para estas sustancias, siendo diferente dentro del ambiente ya que la forma más común de adquirirlos es por ingestión (Hoet y Lauwreys, 1993). Los bifenilos altamente clorados son almacenados en los tejidos grasos, mientras que los escasamente clorados pueden ser metabolizados vía hidroxilación a formas excretables. No obstante los metabolitos fenólicos producidos pueden ser más tóxicos que la molécula madre original.

La biomagnificación de las concentraciones de estos compuestos se observa en los altos niveles tróficos, debido a que los BPC's en un organismo son pasados a otro, ascendiendo en la cadena alimentaria. Un organismo en particular puede acumular los BPC's de 100 o muchos más organismos pequeños y con ello incrementar la concentración total contenida en su cuerpo (Environment Canadá, 1988), la cual si se encuentra almacenada en el tejido graso puede no causar efectos adversos; los problemas surgen cuando el organismo llega a estar estresado y sus grasas acumuladas son agotadas, liberando previamente los BPC's almacenados al interior de la circulación (Ott *et al*, 1996).

V.3 Toxicidad.

Los BPC's son introducidos al cuerpo por ingestión, vía dérmica e inhalación, se incorporan al torrente sanguíneo y posteriormente son acumulados en el hígado y músculo esquelético donde son metabolizados y redistribuidos al tejido adiposo. Diferentes estudios muestran que los BPC's son compuestos que se acumulan y almacenan en las grasas y tejidos.

La concentración de los BPC's en los organismos depende de diferentes factores como son: el grado de contaminación de sus alrededores, cantidad de grasa contenida en el organismo y su nivel trófico en la cadena alimentaria (Organización Panamericana de la Salud, 1979)

La toxicidad de los BPC's depende del nivel de cloración y el tiempo de exposición. Así, efectos tóxicos agudos han sido causados por concentraciones relativamente altas en un periodo de tiempo corto, mientras efectos tóxicos agudos resultan de periodos largos de exposición pero a concentraciones pequeñas. Los bifenilos policlorados raramente pueden causar toxicidad aguda, la DL50 (dosis que provoca la muerte del 50% de una población de determinadas especies de animales de laboratorio) varía según el isómero del que se trate entre el rango de 0.5 g/Kg a 11.3 g/Kg (Sullivan y Krieger, 1992). Puede decirse que la mayoría de efectos observados son el resultado de una exposición crónica o repetitiva.

Entre las alteraciones provocadas por estas sustancias se incluyen, la degradación de hormonas esteroides (provocando problemas reproductivos), alteraciones gástricas, tractiperpasia urinaria, lesiones dermales, dolor abdominal y cloracné. En mamíferos la toxicidad de estas sustancias puede tener resultados teratogénicos, reducción de la fertilidad y aborto inducido, porpíria, inmunosupresión, mutagenicidad y carcinomas (Bousher, *et al*, 1996).

Uno de los ejemplos más conocidos de la toxicidad de los BPC's en humanos es el de Japón en 1968. *El Yusho Oil Disease*, fue el resultado del consumo de arroz contaminado por una fuga de Aroclor 1254; resultando afectadas de 1,200 a 1,600 personas quienes mostraban síntomas como el incremento de la pigmentación de la piel, cloracné, síntomas gastrointestinales sistémicos con ictericia, edema y dolores abdominales, incremento en las

secreciones oculares, debilidad y hepatotoxicidad (Organización Panamericana de la Salud, 1979; SEMARNAP, 1995).

Algunas personas afectadas evidenciaban síntomas de cloracné aun después de tres años de exposición a los BPC's y en 1973 se supo que habían fallecido 22 de estas personas (SEMARNAP, 1995).

Por otro lado, si los BPC's se ven involucrados en un incendio, aunque ellos mismos no son combustibles, generan los mortales furanos y dioxinas, que son gases que se generan a altas temperaturas entre los 300 y 600 °C, con efectos aun más tóxicos, provocando carcinomas y teratogenicidad al incorporarse a seres vivos ya sea por vía dermal u oral.

Entre los principales efectos que llegan a producir los mencionados furanos y dioxinas se encuentran: cloracné, hinchazón de párpados, pigmentación de uñas, fatiga, náuseas, vómito, diarrea, lesiones hepáticas, carcinomas, entorpecimiento de brazos y piernas, trastornos nerviosos, genéticos, inmuno-supresión y alteraciones en la reproducción (SEMARNAP, 1995).

Los efectos a la salud en mujeres embarazadas, consisten en un incremento de anemia, edema y susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Los bebés de esas mujeres pesan de 160-190 g menos que el control y la circunferencia de su cabeza al nacer es desproporcionadamente pequeña en relación con su peso y edad. A los 7 meses de edad disminuyen en más del 10% su memoria visual y se ha sugerido efectos nocivos en el cerebro (Mason, 1995). La presencia de bifenilos policlorados en bebés es debida al tránsito durante el desarrollo del feto y principalmente por su consumo al nacer a través de la leche materna rica en lípidos donde se almacena la mayoría de los bifenilos policlorados (Hoet, 1973; Organización Panamericana de la Salud, 1979).

V.4 Biodegradación de Bifenilos Policlorados.

Una de las propiedades de los BPC's que más contribuyó a su éxito en la industria es su estabilidad química y esta característica es la principal causa de su creciente acumulación en el ambiente. Los BPC's son extremadamente resistentes a la destrucción química y a la destrucción biológica por procesos naturales.

Actualmente existen métodos para la eliminación de BPC's, que van desde tratamientos térmicos, químicos y físicos (Woodyard, 1989), los cuales por sus características resultan inoperables para la restauración de sitios naturales.

Es por esta razón que se han realizado muchas investigaciones en torno a la capacidad de biodegradación de BPC's por diferentes microorganismos. Las investigaciones acerca de la biodegradación de BPC's en suelo, sedimentos, lagos y ríos muestra que tanto microorganismos aerobios como anaerobios descomponen y metabolizan los BPC's, aunque en diferente grado y velocidad. Las grandes cantidades liberadas de estas sustancias

dentro del ambiente evidentemente ejercen un fuerte efecto de selección en microorganismos que sean capaces de transformar o eliminar estos compuestos. A la fecha han sido reportados un número considerable de géneros microbianos que tienen la capacidad de degradar los BPC's. La tabla 4 muestra los microorganismos que han sido reportados como degradadores de BPC's y el tipo sobre el cual trabajan.

Tabla 4. GENEROS Y ESPECIES BACTERIANAS REPORTADOS COMO DEGRADADORES DE BPC's.

Microorganismo	Bifenilos policlorados que degradan
<i>Achromobacter sp</i>	Monoclorobifenilos, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ^{1, 3, 6, 21}
<i>Acinetobacter sp</i>	Monoclorobifenilos, diclorobifenilos, triclorobifenilos, Kaneclors KC200 y Kaneclors KC500. ^{1, 3, 5, 6, 14, 16}
<i>Aeromonas sp</i>	No lo especifica ²
<i>Agrobacterium sp</i>	Bifenilo, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ⁹
<i>Alkaligenes sp</i>	Bifenilo, diclorobifenilos, triclorobifenilos y pentaclorobifenilos. ^{6, 13}
<i>Alkaligenes denitrificans</i>	Aroclor 1242. ^{2, 9}
<i>Alkaligenes eutrophus</i>	Diclorobifenilos, triclorobifenilos, tetraclorobifenilos, pentaclorobifenilos, hexaclorobifenilos, Aroclor 1242, 1248 y 1254. ^{19, 21}
<i>Alkaligenes odorans</i>	Aroclor 1242. ^{2, 9}
<i>Alkaligenes piechaudii</i>	Diclorobifenilos y triclorobifenilos. ⁷
<i>Alkaligenes xylosoxidans</i>	Diclorobifenilos, triclorobifenilos y tetraclorobifenilos. ⁷
<i>Arthrobacter sp</i>	Bifenilo y tetraclorobifenilos. ^{3, 6}
<i>Aureobacterium saperdae</i>	Bifenilo y diclorobifenilos. ^{1, 3}
<i>Bacillus sp</i>	Bifenilo, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ^{3, 9}
<i>Bacillus brevis</i>	Monoclorobifenilos. ²⁰
<i>Bacillus cereus</i>	Bifenilo y diclorobifenilos. ^{1, 3}
<i>Brevibacterium sp</i>	Bifenilo, monoclorobifenilos, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ⁶
<i>Citrobacter freundii</i>	Bifenilo, diclorobifenilos, tetraclorobifenilos y Aroclor 1242. ^{1, 3}
<i>Comamonas testosteroni</i>	Bifenilo, diclorobifenilos, triclorobifenilos, tetraclorobifenilos y Aroclor 1242. ^{1, 3, 22}
<i>Corinebacterium sp</i>	Bifenilo, tetraclorobifenilos, pentaclorobifenilos, hexaclorobifenilos y Aroclor 1242. ^{1, 3, 6, 21}
<i>Enterobacter sp</i>	Bifenilo, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ⁹
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Aroclor 1242. ^{1, 3}
<i>Erwinia herbicola</i>	Bifenilo, diclorobifenilos y tetraclorobifenilos. ^{1, 3}
<i>Flavobacterium sp</i>	Bifenilo, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ⁹

Tabla 4. GÉNEROS Y ESPECIES BACTERIANAS REPORTADOS COMO DEGRADADORES DE BPC's.

<i>Micrococcus sp</i>	No lo especifica ³
<i>Pseudomonas sp</i>	Bifenilo, diclorobifenilos, triclorobifenilos, tetraclorobifenilos, pentaclorobifenilos, hexaclorobifenilos y Aroclor 1254. ^{5, 6, 17}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bifenilo, diclorobifenilos y Aroclor 1242. ^{11, 12}
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bifenilo, diclorobifenilos, triclorobifenilos, tetraclorobifenilos y Aroclor 1242. ^{1, 3, 7}
<i>Pseudomonas gladii</i>	Bifenilo y monoclorobifenilo. ²¹
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Bifenilo, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ⁹
<i>Pseudomonas putida</i>	Bifenilo, diclorobifenilos, tetraclorobifenilos, hexaclorobifenilos, Aroclor 1242 y 1248. ^{3, 4, 6, 8, 10, 11, 18, 19}
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Diclorobifenilos, triclorobifenilos y tetraclorobifenilos. ⁷
<i>Pseudomonas testosteroni</i>	Monoclorobifenilos, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ^{4, 13}
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Bifenilo Aroclor 1242. ^{1, 3}
<i>Rhodococcus erithropopolis</i>	Diclorobifenilos, triclorobifenilos, tetraclorobifenilos y pentaclorobifenilos. ^{1, 3}
<i>Streptomyces sp</i>	No lo especifica ³
<i>Vibriofaeromonas sp</i>	No lo especifica ³
<i>Xantomonas campestris</i>	Bifenilo, diclorobifenilos, tetraclorobifenilos y Aroclor 1242. ^{1, 3}
<i>Xantomonas maltophilia</i>	Bifenilo, monoclorobifenilo, diclorobifenilos y triclorobifenilos. ²²

1. Boyle *et al* (1992). 2. O'Learly *et al* (1996). 3. Furukawa *et al* (1977). 4. Kimbara *et al* (1988). 5. Irving (1996). 6. Walia *et al* (1988). 7. Dercova *et al* (1995). 8. Roberts (1987). 9. Clark *et al* (1979). 10. Lajoie *et al* (1994). 11. Hickey *et al* (1993). 12. Romanov *et al* (1994). 13. Furukawa *et al* (1976). 14. Furukawa *et al* (1979). 15. Pretigrew *et al* (1990). 16. Furukawa *et al* (1983). 17. Saylor *et al* (1977). 18. Fiebig *et al* (1993). 19. Bernard *et al* (1986). 20. Masse *et al* (1984). 21. Bernard *et al* (1987). 22. Pellizari *et al* (1996).

Aunque pequeñas concentraciones de BPC's pueden estimular el crecimiento de microorganismos por constituirse como una fuente de carbono, grandes concentraciones son tóxicas para los microorganismos. La degradación microbiana de BPC's depende del grado de cloración y la posición del átomo de cloro sustituido en el anillo. Varios reportes muestran que la degradación disminuye al ir aumentando el grado de cloración de los BPC's. Además es evidente que una variedad de factores afectan la degradación microbiana en el ambiente entre los cuales se encuentran: la solubilidad en agua y volatilidad de los BPC's, pH, temperatura, oxígeno, nutrientes en el ambiente, emulsificación de los BPC's y adsorción por varios materiales del suelo, sedimentos, lodos y materiales biológicos en diferentes combinaciones.

Como resultado de la investigación en torno a estos compuestos, se ha llegado a considerar dos factores, los cuales tienen gran influencia en la biodegradación. Dichos factores son el uso de sustancias que promuevan el cometabolismo de BPC's y la adición de tensoactivos o surfactantes con el fin de aumentar la biodisponibilidad de tales sustancias..

El efecto de la adición de sustancias orgánicas para promover un cometabolismo, aún es muy discutido debido a los diferentes resultados obtenidos por los investigadores. La Tabla 5 hace una comparación del efecto obtenido por diferentes autores al utilizar diferentes sustancias para promover el cometabolismo y por tanto la biodegradación.

Tabla 5. EFECTO DE LA UTILIZACION DE DIFERENTES SUSTANCIAS EN LA DEGRADACION DE BPC's.		
Promotores de cometabolismo	Efecto en la degradación de BPC's	
	Positivo	Negativo
Glucosa		X ^{2,3,7}
Peptona	X ¹	X ²
Extracto de levadura	X ¹	X ²
Glicerol		X ²
Naftaleno	X ⁰	
Bifenilo	X ^{2,3,8,9,10,11,12}	X ⁷
Acido húmico		X ²
Acido clorobenzoico		X ¹

1. Yagi *et al.*, 1980; 2. Tulp *et al.*, 1978; 3. Kong *et al.*, 1983; 4. Focht, 1995; 5. Haddock *et al.*, 1992; 6. Chaprwalla *et al.*, 1992; 7. Dercova *et al.*, 1994; 8. Viney *et al.*, 1990; 9. Chatterjee *et al.* 1982; 10. Focht *et al.*, 1985; 11. Barriault *et al.*, 1993; 12. Silva *et al.* 1996.

Estos resultados fueron obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo, así como consorcios o diversas cepas bacterianas y por supuesto en la degradación de diferentes tipos de BPC's. Es por esto que no se puede generalizar el efecto de estas sustancias en la degradación de los BPCs.

La utilización de bifenilo como promotor de la biodegradación bacteriana de bifenilos policlorados ha sido muy estudiado. Se han reportado diferentes microorganismos que tienen la habilidad de degradar nuevos substratos por medio de rutas enzimáticas preexistentes, como es el caso de la biodegradación de BPC's, la cual se lleva a cabo con la utilización de enzimas que han sido utilizadas por los microorganismos para la degradación de bifenilo. Las nuevas actividades catabólicas aparentemente fueron adquiridas a través de cambios que contribuyeron a aumentar la especificidad de substratos a enzimas preexistentes y a través de mutaciones que incrementaron los niveles enzimáticos (Chaudhry, 1994). Algunos estudios han reconocido que el bifenilo induce la ruta de

biodegradación de BPC's, al incrementar los niveles enzimáticos. Las enzimas degradadoras de bifenilo, pueden ser usadas para la transformación cometabólica de muchos bifenilos análogos. Algunos autores han reportado que bacterias creciendo en bifenilo pueden cometabolizar BPC's más eficientemente (Brunner *et al*, 1985; Hill *et al*, 1989; Kohler *et al*, 1988).

Por otra parte, la utilización de surfactantes o tensoactivos han sido también utilizados para promover la degradación de BPC's. La biodisponibilidad del sustrato influye de manera directa en la biodegradación convirtiéndose en un factor clave para la su eliminación. Diferentes autores proponen el uso de surfactantes o tensoactivos, ya que mediante su uso, han aumentado de forma significativa la velocidad de biodegradación de BPC's (Chaudhry, 1995; Liu D., 1980; Viney *et al*, 1990).

A pesar de todos los estudios realizados, aún no se han encontrado tanto las condiciones óptimas como un microorganismo o un consorcio microbiano que sea capaz de eliminar en su totalidad ciertas mezclas de BPC's, como el Aroclor 1260 que es el mayormente distribuido en ambientes naturales (Furukawa, 1982).

VI. MATERIAL Y METODOS

VI.1 Aislamiento y Selección del Cultivo Mixto

El cultivo mixto para la degradación de BPC's fue obtenido a partir de un suelo contaminado a causa de derrames consecutivos de aceite de transformador desde hace aproximadamente 10 años.

El aislamiento del cultivo mixto fue realizado mediante la utilización de bifenilo el cual es un compuesto aromático que soporta el crecimiento de un gran número de géneros bacterianos (Haddock *et al*, 1993).

El bifenilo fue utilizado para promover el aislamiento del cultivo, siguiendo las observaciones de varios investigadores (Chaptwala *et al*, 1992; Sugiura, 1992; Haddock *et al*, 1993; Dercova *et al*, 1995 y Pellizari *et al*, 1996, entre otros). Quienes sostienen que muchas bacterias que pueden crecer en bifenilo son capaces también de degradar varios tipos de bifenilos policlorados.

Para el aislamiento del cultivo se resuspendieron 2 gramos de suelo en solución salina (8.5 g NaCl/ 1 L agua destilada) para posteriormente ser pasada por papel filtro y centrifugadas a 35000 rpm para separar las células del medio líquido. Una vez separadas las células, se les sometió a un lavado, resuspendiéndolas nuevamente en solución salina y centrifugándolas a 35000 rpm. El proceso de lavado fue repetido hasta eliminar el último rastro de suelo.

Las células resultantes fueron adaptadas en matraces Erlenmeyer bafleados de 500 ml, conteniendo 100 ml de medio mineral DMA utilizado por Dercova *et al*, (1994) y 0.1g de bifenilo como fuente de carbono. Los matraces fueron incubados durante 7 días en agitación a 100 rpm y temperatura de 30 °C.

El medio mineral DMA consta de 5 partes (Tabla 6), Las partes A, B, C y E fueron disueltas cada una en 500 ml de agua destilada y esterilizadas en autoclave por 15 min a 121 °C. Para la parte D, los 3 primeros ingredientes fueron disueltos por separado, en 100 ml de agua destilada y los tres restantes en 1 L de agua destilada cada uno y esterilizados separadamente, durante 15 min a 121 °C, posteriormente las soluciones se mezclaron en la siguiente proporción de volumen 10:1:1:10:10:10:10, respectivamente. La cantidad resultante (52 ml) se aforó a 500 ml utilizando agua destilada, obteniendo así la parte D.

Las soluciones de la parte A a la parte E, fueron mezcladas en la siguiente proporción 10:1:1:1:10. A 124 ml de esta solución se le agregaron 876 ml de agua destilada, dando como resultado el medio mineral DMA.

Partes	Sustancias	Cantidad en Gramos
A	K_2HPO_4	84.5
B	$MgSO_4 \cdot H_2O$	20.0
C	$CaCl_2$	1.0
D	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	5.0
	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	5.0
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1.0
	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	1.0
	$Na_2B_4O_7$	1.0
E	$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	1.0
	NH_4Cl	20.0

VI.2 Aclimatación del Cultivo Mixto Aislado a Bifenilo

El cultivo fue mantenido viable, realizando resiembras cada 7 días, manteniendo las mismas condiciones descritas en su aislamiento; se realizaron cinéticas de crecimiento por monitoreo cada 24 hrs de la densidad celular presente de acuerdo a 2 métodos:

- Conteo de unidades formadoras de colonia (EPA, 1978; Atlas, 1989) por vaciado en placa utilizando agar nutritivo, mostrado en la Tabla 7.

Sustancia	Gramos por litro de agua destilada
Agar Nutritivo	8.0
Dextrosa	3.0
Agar Bacteriológico	20.0

- Medición de la densidad óptica en espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

VI.3 Aclimatación del Cultivo Mixto a una Mezcla de Bifenilos Policlorados.

La aclimatación del cultivo mixto a BPC's, se inició una vez obtenido un buen crecimiento en el bifenilo. Esta operación se realizó en matraces Erlenmeyer bafleados de 500 ml, conteniendo 100 ml de medio mineral DMA y 400 ppm de una mezcla de bifenilos policlorados la cual fue previamente analizada mediante cromatografía de gases, en el Laboratorio de cromatografía del Instituto Mexicano del Petróleo, utilizando el método: IMPQA-307. Se determinó que la mezcla era similar al patrón del Aroclor 1260.

Inicialmente se corrieron cinéticas de crecimiento, midiendo la concentración celular mediante los métodos de: turbidez, absorbancia a 660 nm y conteo de unidades formadoras de colonia (EPA, 1978; Atlas, 1989) utilizando agar nutritivo.

Posteriormente fue incorporado al sistema la adición de un surfactante para aumentar la disposición del aceite en el medio de cultivo.

VI.3.1 Incorporación del Surfactante Biotrix al Sistema.

Fueron probados tres diferentes surfactantes: Triton, Tween y Biotrix. Los dos primeros fueron eliminados debido a que la emulsión que producían era poco estable. Por su parte, el surfactante Biotrix era capaz de mantener por largo tiempo emulsionados a los BPC's. Una vez elegido el surfactante fueron realizadas pruebas de emulsificación a diferentes concentraciones: 0.05%, 0.08%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1.0%. Las concentraciones arriba del 0.1% mostraron una buena capacidad de dispersar el aceite en el medio de cultivo y mantener la emulsión estable.

Por otro lado, existía la probabilidad que el surfactante Biotrix fuera utilizado por los microorganismos como fuente de carbono, por lo que había la posibilidad de que disminuyera el consumo de BPC's al incorporarlo al sistema. Debido a esto se diseñó un plan de trabajo, mostrado en la Tabla 8. Mediante estas condiciones se pretendía conocer el comportamiento del crecimiento de los microorganismos sobre bifenilos policlorados en presencia y ausencia de surfactante (biodisponibilidad).

Tabla 8. FUENTE DE CARBONO UTILIZADA PARA TRES CINÉTICAS DE CRECIMIENTO SIMULTÁNEAS.

Cultivo	Fuente de carbono utilizada
I	Bifenilos Policlorados (400 ppm)
II	Bifenilos Policlorados (400 ppm) + Biotrix (0.1%)
III	Biotrix (0.1%)

En los tres cultivos fue utilizado 100 ml de medio mineral DMA. y se ajustaron a una densidad óptica de 0.15 a 660 nm. Se incubaron a 30 °C y agitación durante 194 hrs. El crecimiento bacteriano fue medido por unidades formadoras de colonias cada 48 hrs.

VI.4 Medición de la Degradación de Bifenilos Policlorados Después de Ser Sometidos al Cultivo.

La degradación de bifenilos policlorados por el cultivo fue evaluada bajo diferentes condiciones, resumidas en la Tabla 9. Fueron probadas cuatro condiciones específicas: ausencia de bifenilo y surfactante; presencia sólo de bifenilo; presencia sólo de surfactante; y por último presencia de bifenilo y surfactante. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y en presencia de un blanco (mismas condiciones de la prueba respectiva, pero ausencia de microorganismos).

Concentración de BPC's (ppm)	BPC's			
	BPC's	Bifenilo (0.001%)	Surfactante (0.1%)	BPC's Surfactante (0.1%) Bifenilo (0.001%)
	1	2	3	4
A	A1	A2	A3	A4
B	B1	B2	B3	B4
C	C1	C2	C3	C4

Todas las pruebas fueron corridas dentro de matraces Erlenmeyer bafleados de 125 ml, conteniendo 40 ml de medio mineral DMA. Los matraces inoculados se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a una longitud de onda de 660 nm.

Los cultivos fueron incubados en agitación a 150 rpm y a una temperatura de 30 °C durante 30 días.

Es importante mencionar que tanto los matraces empleados durante la incubación, como todo tipo de cristalería utilizada durante el proceso de extracción-purificación de BPC's fue sometida a un lavado especial descrito a continuación:

- 1) Inicialmente el material fue enjuagado 2 veces con hexano, recuperando éste en cada caso en un recipiente de vidrio perfectamente cerrado para su disposición.
- 2) Posteriormente se lavó con agua y jabón. y se colocó en mezcla crómica, durante 1 hr.

3) Pasado ese tiempo, fue purgado con agua destilada y secado en la estufa a 110 °C.

VI.4.1 Extracción de Bifenilos Policlorados de los Medios de Cultivo y Purificación de los Extractos.

La incubación de los cultivos se dio por terminado pasados 30 días, después de los cuales se inició el seguimiento a la extracción-purificación del aceite incorporado a las muestras, de acuerdo a los métodos 8080 y 3620 de la EPA.

1. **Extracción de BPC's.** El medio de cultivo y 50 ml de hexano fueron colocados dentro de un embudo de separación de 250 ml, el embudo se agitó por 3 minutos y posteriormente se dejó reposar, esperando la separación de fases. La fase oleosa (hexano-BPC's) se depositó en un matraz y la fase acuosa (medio de cultivo) dentro del embudo de separación para repetir todo lo anterior 2 veces más.
2. **Destrucción de la materia orgánica.** En un embudo de separación de 250 ml fueron vertidas, las tres partes de hexano (120 ml) obtenidas durante la extracción y 2 ml de ácido sulfúrico-agua (proporción 1:1 v/v). El embudo fue agitado por 2 minutos, después de los cuales se dejó reposar y se eliminó la fase acuosa. Este paso fue repetido las veces necesarias hasta lograr que la fase acuosa quedara clara.
3. **Purificación de la muestra.** Después de haber eliminado la materia orgánica, la muestra se depositó en un Kuderna Danish para evaporarla hasta un volumen de 10 ml, mismos que fueron pasados a través de una columna cromatográfica de 18 mm de diámetro por 300 mm de longitud la cual se empacó en húmedo de la siguiente forma:
 - a) En el fondo de la columna se introdujo lana de vidrio, previamente lavada con 50 ml de acetona seguida de 50 ml de hexano.
 - b) Una vez colocada la fibra de vidrio se agregó hexano dentro de la columna, para enseguida introducir 20 g de florisil malla 60/100, previamente activado a 130 °C por 16 hrs.
 - c) Por último se depositó de 1 a 2 cm de sulfato de sodio anhidro, secado a 100 °C durante 4 hrs.
El hexano en todo momento se encontraba cubriendo totalmente al sulfato de sodio impidiendo su exposición al aire.La muestra se pasó del tubo contenedor de Kuderna Danish a la columna cromatográfica directamente. La columna fue drenada impidiendo la exposición del sulfato de sodio al aire y por último se eluyó la columna con 200 ml de hexano.
4. **Concentración de la muestra.** Por último el eluido fue concentrado en un Kuderna Danish hasta un volumen conocido (5 ml).

VI.4.2 Cuantificación de Bifenilos Policlorados en las Muestras Resultantes.

La cuantificación de BPC's en las muestras extraídas y purificadas corrió a cargo del Laboratorio de Cromatografía del Instituto Mexicano del Petróleo. Las muestras fueron analizadas por el método IMPQA-307.

VI.5 Aislamiento e Identificación de Cepas Bacterianas Presentes en el Cultivo Mixto.

El aislamiento de cepas bacterianas presentes en el cultivo mixto fue realizado, mediante sembrado en placa por el método de estría cruzada, utilizando como sustrato el agar de soya tripticaseína (Tabla 10).

Sustancia	Cantidad en gramos/litro
Peptona de caseína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

Una vez crecidas las colonias, se diferenciaron las cepas por su Morfología Colonial, Morfología Microscópica y reacción al Gram. La morfología colonial consistió del registro de los siguientes parámetros: Color, forma, elevación, superficie, aspecto, bordes, luz reflejada, luz transmitida, y consistencia. En la morfología microscópica se especificó el tipo morfológico (Cocos o Bacilos).

Una vez diferenciadas las cepas por los parámetros antes descritos, se realizaron pruebas bioquímicas a cada una para su identificación, utilizando el Sistema de Identificación para Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram (-) API 20 E y el Sistema de Identificación para no-Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram (-) API 20 NE. Los cuales están avalados por las normas de calidad ISO 9002.

Los sistemas de identificación API 20 E y API 20 NE constan de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Los tubos se inocularon con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios. Durante la incubación el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontáneos o bien al añadir reactivos.

El sistema de identificación da los resultados de las pruebas bioquímicas a través de una clave de siete números, los cuales son incluidos en un programa informático para la identificación de la cepa.

Las Pruebas bioquímicas incluidas en los sistemas de identificación API 20 E y API 20 NE se encuentran enlistadas en las Tablas 11 y 12 respectivamente.

Pruebas bioquímicas
β -galactosidasa
Arginina dehidrolasa
Lisina descarboxilasa
Ornitina descarboxilasa
Utilización de citrato
Producción de H_2S
Ureasa
Triptofano desaminasa
Producción de indol
Producción de acetoina
Gelatinasa
Fermentación oxidación/oxidación de glucosa
Fermentación oxidación/oxidación de manitol
Fermentación oxidación/oxidación de inositol
Fermentación oxidación/oxidación de sorbitol
Fermentación oxidación/oxidación de ramnosa
Fermentación oxidación/oxidación de sacarosa
Fermentación oxidación/oxidación melibiosa
Fermentación oxidación/oxidación de amigdalina
Fermentación oxidación/oxidación de arabinosa
Citocromo oxidasa
Producción de NO_2
Reducción a gas N_2
Movilidad
Crecimiento en medio MacConkey
Fermentación u oxidación de glucosa

Tabla 12. SISTEMA DE IDENTIFICACION PARA BACILOS GRAM (-) NO ENTEROBACTERIACEAE API 20 NE

Pruebas bioquímicas
Reducción de nitratos a nitritos
Reducción de nitratos a azóe
Formación de indol
Fermentación de glucosa
Arginina dihidrolasa
Ureasa
Hidrolisis (β -glucosidasa) de esculina
Hidrolisis de proteasa de gelatina
β -galactosidasa
Asimilación de glucosa
Asimilación de arabinosa
Asimilación de manosa
Asimilación manitol
Asimilación de n-acetil-glucosa
Asimilación de maltosa
Asimilación de gluconato
Asimilación caprato
Asimilación de adipato
Asimilación de malato
Asimilación de citrato
Asimilación de fenil-acetato

Además fueron realizadas algunas pruebas extras necesarias para la identificación como son: la prueba de catalasa, movilidad, anaerobiosis y crecimiento a 41°C y 45°C, las cuales se explican a continuación.

- **Catalasa.** Fue depositada una colonia perfectamente aislada sobre un portaobjetos y enseguida se agregó una gota de peróxido de hidrógeno y se observó la reacción. La cepa es catalasa positiva si presentó efervescencia. Esta prueba es realizada para establecer la presencia o ausencia de la enzima catalasa. La enzima catalasa degrada el peróxido de hidrógeno, obteniendo como productos resultantes $H_2O + O_2$, los cuales son los responsables de la efervescencia.
- **Movilidad.** Para esta prueba fue utilizado el medio "M" que es una parte complementaria del sistema de identificación API. La cepa es sembrada por picadura en tubos que contiene el medio "M" e incubados a una temperatura de 35-37 °C durante 24-48 hrs. La cepa es móvil si se difunde en todo el tubo.

- **Anaerobiosis.** Son inoculados tubos con caldo nutritivo, los cuales posteriormente fueron cubiertos con aceite mineral impidiendo la entrada de oxígeno. Los tubos fueron incubados a 30°C durante 48 hrs. La cepa es anaerobia facultativa si se presenta crecimiento en el tubo.
- **Crecimiento a 41°C y 45°C.** Fueron inoculados tubos de agar nutritivo con las cepas aisladas y posteriormente incubadas a las temperaturas mencionadas.

Una vez aisladas e identificadas las cepas bacterianas fueron conservadas por congelación a -80°C utilizando para este fin el medio de conservación descrito en la Tabla 13.

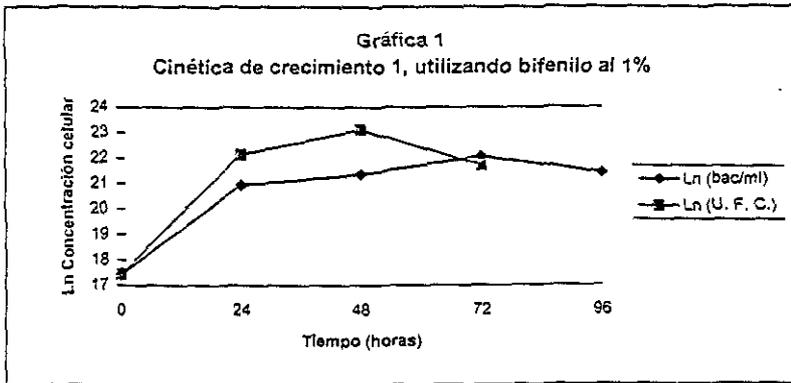
Tabla 13. MEDIO DE CONSERVACION	
Sustancia	Concentración
KH_2PO_4	3 g/l
K_2HPO_4	7 g/l
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$	0.5 g/l
MgSO_4	0.1 g/l
$\text{C}_3\text{H}_8(\text{OH})_3$	50 % v/v
El medio es ajustado a un pH de 7	

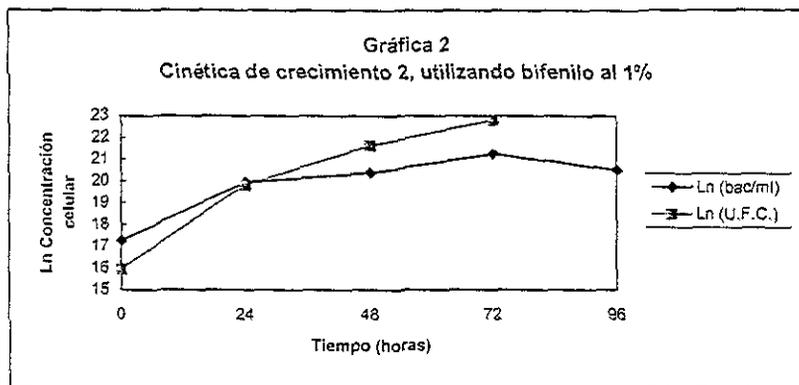
VII. RESULTADOS Y DISCUSION.

Inicialmente fue aislado un cultivo mixto a partir de una columna empacada, la cual fue diseñada para seleccionar microorganismos capaces de degradar hidrocarburos y/o producir metabolitos con actividad emulsificante. El cultivo fue capaz de crecer sobre bifenilo, pero una vez terminada su aclimatación y ser sometido a BPC's como única fuente de carbono, el cultivo no tuvo la capacidad de crecer.

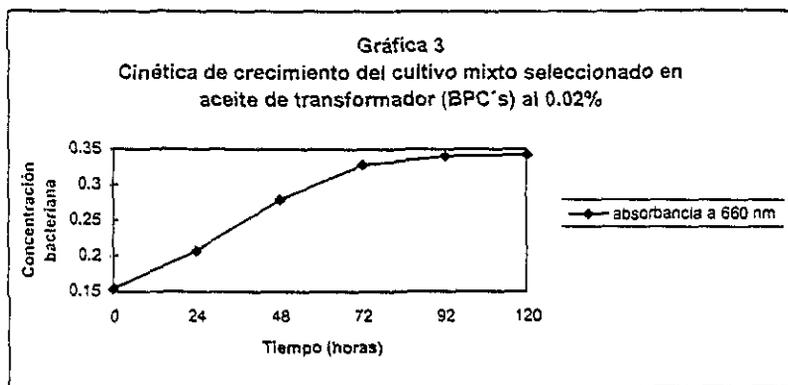
Debido a esto fue iniciado un nuevo aislamiento pero ahora a partir de un suelo contaminado con aceite de transformador.

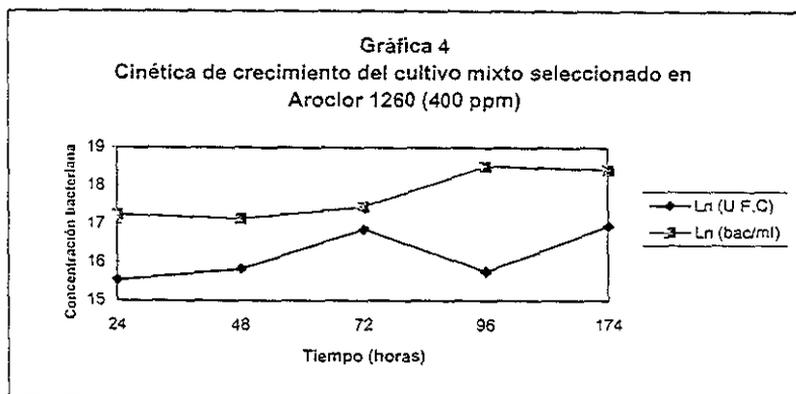
El cultivo aislado con la utilización de bifenilo, presentó su máximo crecimiento entre las 48 y 72 hrs de incubación (Gráficas 1 y 2) presentando la formación de una coloración amarilla típica en la degradación de bifenilo. Dicha coloración ha sido monitoreada en otras investigaciones para medir indirectamente la biodegradación de bifenilo.





Después de ser aclimatado el cultivo al bifenilo y ser sometido a un nuevo sistema el cual contenía una mezcla de Aroclor 1260 como única fuente de carbono, el crecimiento se reduce, según se muestra en las cinéticas de crecimiento (Gráficas 3 y 4). Lo cual era de esperarse, dado que los BPC's, por su complejidad son mucho más difíciles de metabolizar que el bifenilo.





El bajo crecimiento de los microorganismos refleja de forma indirecta una escasa biodegradación de BPC's. Es debido a esto que fue realizada una extensa revisión bibliográfica, acerca de las estrategias que otros investigadores han utilizado para promover el crecimiento bacteriano y por ende, la degradación de BPC's.

Entre los métodos más reportados para promover la biodegradación de BPC's se encuentran los siguientes.

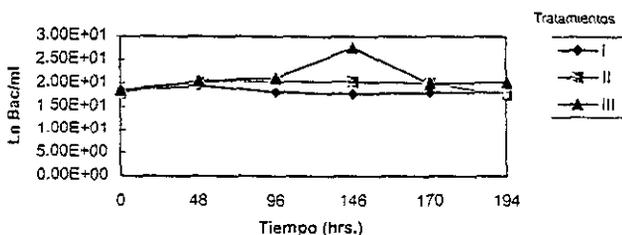
- ⇒ Uso de surfactantes
- ⇒ Uso de cosustratos

Debido a esto, se determinó aplicar tales métodos en el desarrollo de la investigación, con la finalidad de obtener un mayor crecimiento en los cultivos estudiados.

Para hacer uso de un surfactante, fueron realizadas algunas pruebas debido a la posibilidad de que el surfactante utilizado pudiera inhibir la degradación de BPC's por vía microbiana en función de una viabilidad mayor por el consumo de surfactante. Debido a lo anterior fueron montadas tres cinéticas de crecimiento simultáneas (Ver sección VI.3.1), las cuales indicarían si el surfactante Biotrix, es utilizado por el cultivo como fuente de carbono y cómo es el crecimiento del cultivo que contiene tanto surfactantes como BPC's, en comparación con el que contiene sólo BPC's.

Los resultados de estas cinéticas son mostrados en la Gráfica 5 y evaluados por medio de un análisis de varianza, el cual concluyó que no existía diferencia entre los tres tratamientos a un intervalo de significancia de 0.05.

Gráfica 5
CINETICAS DE CRECIMIENTO PARA LA
EVALUACION DEL SURFACTANTE BIOTRIX



De acuerdo con esto, el cultivo mixto es capaz de crecer igualmente en presencia exclusiva de surfactante, así como en presencia de BPC's y surfactante juntos. Pero además, considerando que no existió una diferencia significativa en los tres tratamientos contemplados, se presenta la posibilidad de que el cultivo utilice al surfactante y no a los BPC's cuando se encuentran ambos presentes, por lo que era necesario contar con datos acerca del total de BPC's consumidos por el cultivo bajo estas condiciones para poder concluir acerca del papel que juega el surfactante dentro del sistema.

Por otra parte, durante el desarrollo de la experimentación y basados en la revisión bibliográfica (Yagi *et al.*, 1980; Tulp *et al.*, 1978; Kong *et al.*, 1983; Focht, 1995; Haddock *et al.*, 1992; Chaprwala *et al.*, 1992; Dercova *et al.*, 1994; Viney *et al.*, 1990; Chattergee *et al.* 1982; Fotcht *et al.*, 1985; Barriault *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 1996), fue incorporado el segundo método para favorecer la biodegradación de BPC's por el cultivo. Dicho método consiste en la utilización de un cosustrato para lo cual se utilizó el bifenilo pero en una concentración mucho menor que durante la aclimatación de los microorganismos a éste.

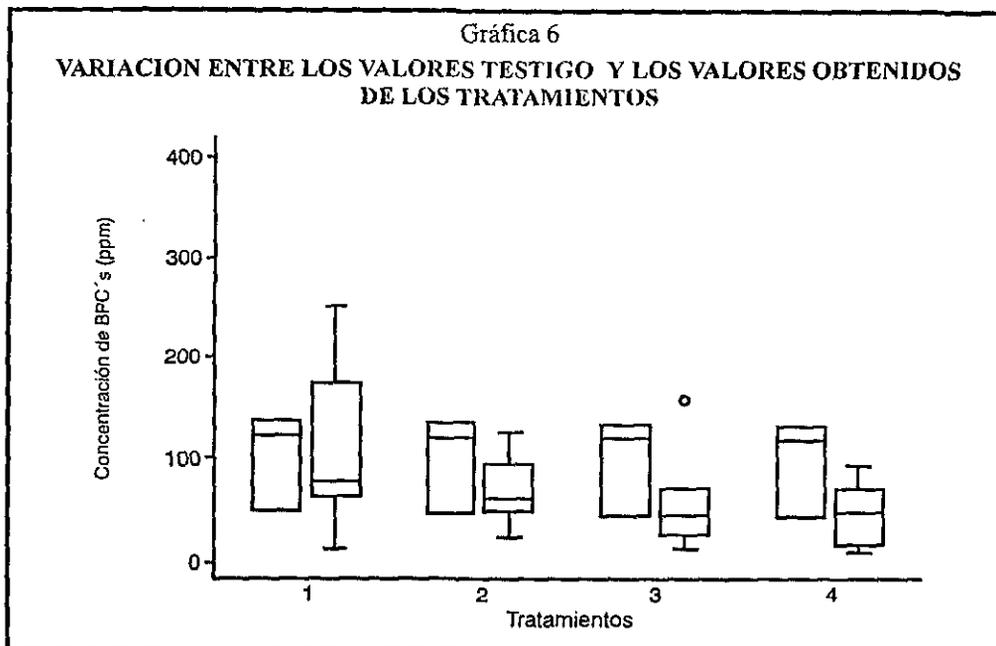
Una vez considerado tanto al surfactante como al cosustrato, fue diseñado un esquema de trabajo (Ver sección VI.4), para evaluar la degradación inicial y final de BPC's con la utilización de las diferentes variables.

La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos bajo las diferentes condiciones ensayadas.

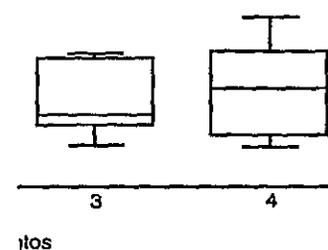
Tabla 14. VALORES OBTENIDOS POR EL ANÁLISIS DE CROMATOGRAFIA DE GASES DE LAS MUESTRAS PROCESADAS

Concentración de BPC's en las muestras testigo (ppm)	1 BPC's	2 BPC's Bifenilo (0.001%)	3 BPC's Surfactante (0.1%)	4 BPC's Surfactante (0.1%) Bifenilo (0.001%)
A	252.5	123.75	418.75	98.75
	210	128.75	162.5	87.5
137.92	176.25	95	35	66.25
B	76.25	58.75	71.25	50
	78.75	63.75	15.5	76.25
123.33	93.75	97.5	74.375	53.75
C	63.75	31.25	31.25	15.625
	31.875	51.25	48.5	22.5
48.75	12.625	26.875	29.125	15.25
Mediana	123.33	78.75	35	53.75

Estos resultados fueron evaluados estadísticamente, por análisis de varianza para determinar si existía una diferencia significativa, entre los valores testigo y cada uno de los datos obtenidos en los cuatro tratamientos. El análisis de varianza permite concluir que a un nivel de significancia de 0.05 existe diferencia significativa entre los valores testigo y los valores de los diferentes tratamientos. La Gráfica 6 muestra más claramente este comportamiento.



BPC's ENTRE TRATAMIENTOS



tos

por disminución de BPC's por acción

La gráfica compara la mediana de cada uno de los tratamientos con respecto a la mediana de los valores testigo, y como se observa, existe una clara disminución en la concentración de BPC's en los cuatro tratamientos. Con esto se concluye que existió biodegradación de BPC's por el cultivo mixto.

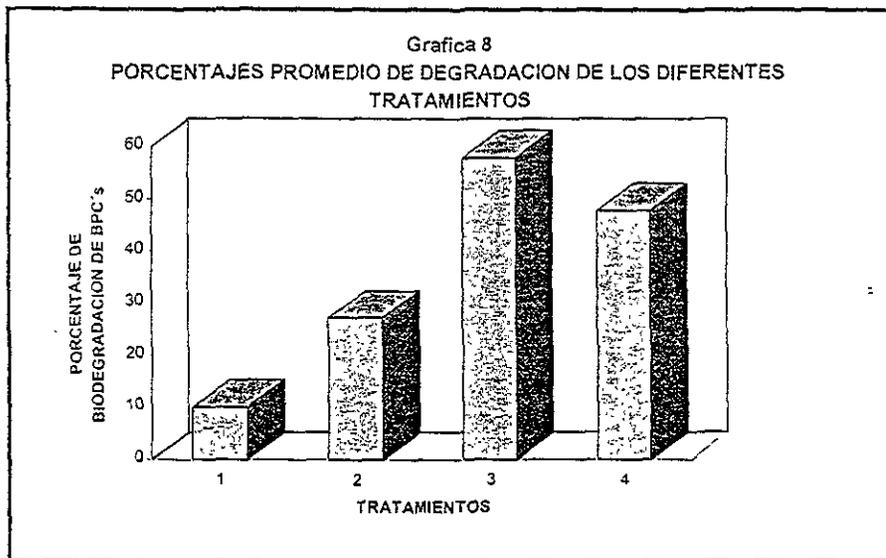
Una vez teniendo la certeza de biodegradación, se realizó otro análisis de varianza pero ahora entre los valores de los cuatro diferentes tratamientos, esto, con el fin de saber en cual de ellos existió la mayor disminución de BPC's por la acción microbiana y si existe una diferencia real entre los diferentes tratamientos.

Inicialmente se realizó un análisis de varianza, el cual nos permite concluir que existe diferencia a un nivel de significancia de 0.1. Posteriormente fue realizado un procedimiento de comparación múltiple llamado método de Bonferroni (Anaxo 1). De acuerdo con este método, el tercer tratamiento, es decir, el tratamiento que incluye surfactante es el más diferente de todos, considerando un nivel de significancia de 0.1. La Gráfica 7 ilustra la diferencia entre tratamientos.

mejor si se muestran gráficamente el la tratamiento (Gráfica 8). Los cuales

en los cuales se utilizó al surfactante

Mónica Jazmín Hernández Gayosso.



Con los resultados de biodegradación (Gráficas 6, 7, 8), pudo evaluarse el verdadero efecto tanto del surfactante, como del bifenilo en la biodegradación de BPC's.

Analizando los resultados puede observarse, que el tratamiento I, el cual solo contenía BPC's como única fuente de carbono, presentó una degradación menor al resto de los tratamientos. Existen estudios en los que se han obtenido porcentajes de degradación mucho mayores incluso hasta de un 99%, como es el caso de Kong (1983), pero en estos se ha degradado solo monoclorobifenilos y diclorobifenilos los cuales no representan problema para los microorganismos debido a su baja cloración. (Departament of Health and Human Services, 1996).

La presencia del bifenilo en el tratamiento II, mejoró en buena medida la biodegradación, lo cual viene a confirmar las observaciones de: Focht, 1995; Haddock *et al*, 1992; Chaptwala *et al*, 1992; Viney *et al*, 1990; Chartergee *et al*, 1982; Focht *et al*, 1985 y Barriault *et al*, 1993; en las cuales la utilización de bifenilo se proyectaba como un promotor de la biodegradación de BPC's, debido a que aumenta los niveles enzimáticos de las bacterias. La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos por diferentes investigadores al utilizar al bifenilo como cosustrato.

Tabla 15. PORCENTAJES DE BIODEGRADACION DE BPC's OBTENIDOS AL UTILIZAR AL BIFENILO COMO COSUSTRATO

Autor	Microorganismo	Porcentaje de degradación y tipo de PCB's	Tiempo en semanas
Focht et al, 1985	Microflora autóctona del suelo	25-35% Aroclor 1242	7
Viney et al, 1990	<i>Phanerocheate chrisosporium</i>	40% Aroclor 1242	20
Barriault et al, 1995	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	50% Aroclor 1242	3
Focht, 1995	Microflora autóctona del río Hudson	37-55% Aroclor 12 42	10

En este estudio el porcentaje de degradación obtenido al utilizar el bifenilo como cosustrato fue de 27% pero no es posible realizar una comparación dado que las condiciones como: tipo de microorganismos, sustratos, mezcla de BPC's y tiempo entre otras, son diferentes, sin embargo resulta muy importante el hecho de que la mezcla degradada sea de las más recalcitrantes.

El tratamiento III en el cual fue incluido al surfactante Biotrix, se perfiló como el sistema con mayor degradación (57% de degradación de Aroclor 1260).

Como se mencionó con anterioridad, uno de los mayores problemas para eliminar los BPC's por medios biológicos es su baja solubilidad en agua. lo cual impide que éstos, se encuentren completamente disponibles para los microorganismos. Es debido a esto que algunos investigadores incluyeron en sus sistemas de degradación el uso de surfactantes, tal es el caso de Viney *et al* (1990) quien utilizó Tritón X100 y Tensoxid S50.

En el caso del presente estudio, el surfactante utilizado no inhibió la degradación del Aroclor 1260 el cual esta caracterizado por sus altos grados de cloración, en cambio, además de dispersar los BPC's en el medio de cultivo, pudo haber sido utilizado por los microorganismos como un sustrato extra, debido a que el cultivo puede utilizar tanto a la mezcla de BPC's como al Biotrx como fuente de carbono, según los resultados de las cinéticas de crecimiento mostrados en la Gráfica 5.

Para el tratamiento IV pudo haberse esperado un mejor resultado dado que el sistema contaba tanto con bifenilo como con un surfactante, pero se obtuvo una degradación menor que en el tratamiento III (47% de degradación en el tratamiento IV). Esto tal vez se debió a la presencia de dos fuentes alternativas de carbono las cuales se supone son mas fácilmente metabolizables que los BPC's, por lo que los microorganismos pudieron tener preferencia por estas. Esto hace pensar que la biodegradación aumentaría si se disminuyera la cantidad del bifenilo y del surfactante, o en su defecto el aumentar el tiempo de cultivo.

Es importante hacer notar que la mezcla de BPC's con la que se trabajó, es del tipo Aroclor 1260 lo cual es de gran importancia dado que de todas las mezclas fabricadas es el más abundante en el ambiente (FURUKAWA, 1982). Su gran persistencia se ha atribuido al alto grado de cloración de los isómeros que lo constituyen (Tabla 16). Tal composición dificulta su degradación ya sea por medios físicos o biológicos dentro del medio ambiente

Pentaclorobifenilos	12%
Hexaclorobifenilos	38%
Heptaclorobifenilos	41%
Octaclorobifenilos	8%
Nonaclorobifenilos	1%

Organización Panamericana de la Salud, 1979;
Department of Health and Human Services, 1996

Tomando en cuenta la constitución del Aroclor 1260 y el porcentaje de degradación obtenido en el tratamiento III del 57% se infiere que el cultivo mixto, tiene la capacidad de degradar pentaclorobifenilos, hexaclorobifenilos y heptaclorobifenilo, lo anterior, si el cultivo se enfocara a metabolizar los isómeros menos clorados. Una visión más amplia podría tenerse si se contara con un análisis de cromatografía de gases, el cual proporcionara la cantidad y tipo de isómero que fue metabolizado.

A la fecha las investigaciones desarrolladas en torno a la degradación de BPC's, solo se ha restringido a mezclas menos cloradas como el Aroclor 1221 y Aroclor 1242, o a isómeros puros como es el caso de los monoclorobifenilos y diclorobifenilos.

El aislamiento e identificación de las cepas presentes en el cultivo mixto fueron realizados una vez que se tuvo evidencia de la capacidad de degradación de BPC's.

Fueron aisladas e identificadas 4 cepas: *Flavobacterium indologenes*, *Pseudomona sp 1*, *Pseudomona sp 2* y *Acaligenes sp*. Inicialmente las cepas fueron diferenciadas por morfología colonial y morfología microscópica (Tabla 16).

Tabla 17 MORFOLOGIA COLONIAL Y MICROSCOPICA DE CEPAS AISLADAS A PARTIR DEL CULTIVO

Cepas aisladas	Reacción al Gram	Morfología colonial	Morfología microscópica
<i>Flavobacterium indologenes</i>	Negativo	Color: crema Forma: circular Elevación: convexa Superficie: lisa Aspecto: húmedo Bordes: regulares Luz reflejada: brillante Luz transmitida: translúcida Consistencia: cremosa	Bacilos
<i>Pseudomonas sp 1</i>	Negativo	Color: amarilla Forma: circular Elevación: convexa Superficie: lisa Aspecto: húmedo Bordes: regulares Luz reflejada: brillante Luz transmitida: opaca Consistencia: cremosa	Bacilos
<i>Pseudomonas sp 2</i>	Negativo	Color: amarilla Forma: circular Elevación: convexa Superficie: lisa Aspecto: húmedo Bordes: regulares Luz reflejada: brillante Luz transmitida: opaca Consistencia: mucosa	Bacilos
<i>Alcaligenes sp</i>	Negativo	Color: crema Forma: circular Elevación: convexa Superficie: lisa Aspecto: poco húmedo Bordes: regulares Luz reflejada: brillante Luz transmitida: translúcida Consistencia: cremosa	Bacilos

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas por los sistemas de identificación API 20 E y API 20 NE son presentados en la Tablas 17 y 18, respectivamente.

Para la identificación las dos diferentes *Pseudomonas* y el genero *Alcaligenes* fue necesario realizar pruebas extras(Tabla 19).

Tabla 18. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DEL SISTEMA DE IDENTIFICACION API 20 E

Pruebas bioquímicas contempladas	<i>Flavobacterium indologenes</i>	<i>Pseudomonas sp 1</i>	<i>Pseudomonas sp 2</i>	<i>Alcaligenes sp</i>
β-galactosidasa	+	+	-	-
Arginina dehidrolasa	-	-	+	+
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-
Utilización de citrato	-	+	+	+
Producción de H ₂ S	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-
Triptofano desaminasa	-	-	-	-
Producción de indol	+	-	-	-
Producción de acetoina	-	+	+	-
Gelatinasa	+	+	-	-
Fermentación /oxidación de glucosa	-	-	-	-
Fermentación /oxidación de manitol	-	-	-	-
Fermentación /oxidación de inositol	-	-	-	-
Fermentación /oxidación de sorbitol	-	-	-	-
Fermentación /oxidación de ramnosa	-	-	-	-
Fermentación /oxidación de sacarosa	-	-	-	-
Fermentación /oxidación melibiosa	-	-	-	-
Fermentación /oxidación de amigdalina	-	-	-	-
Fermentación /oxidación de arabinosa	-	-	-	-
Citocromo oxidasa	+	+	+	+

Tabla 19. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DEL SISTEMA DE IDENTIFICACION API 20 NE

Pruebas bioquímicas contempladas	<i>Flavobacterium intologenes</i>	<i>Pseudomonas sp 1</i>	<i>Pseudomonas sp 2</i>	<i>Alcaligenes sp</i>
Reducción de nitratos a nitritos o reducción de nitratos a azóe	-	+	+	+
Formación de indol	+	-	+	-
Fermentación de glucosa	-	-	+	-
Arginina dihidrolasa	-	-	+	+
Ureasa	-	-	-	-
Hidrólisis (β -glucosidasa) de esculina	+	+	-	-
Hidrólisis de proteasa de gelatina	+	+	-	-
β -galactosidasa	+	+	+	-
Asimilación de glucosa	+	+	+	+
Asimilación de arabinosa	+	-	-	-
Asimilación de manosa	+	-	-	-
Asimilación manitol	-	-	+	-
Asimilación de n-acetil-glucosa	-	-	-	-
Asimilación de maltosa	+	-	-	-
Asimilación de gluconato	-	+	+	+
Asimilación caprato	-	+	-	+
Asimilación de adipato	-	-	+	+
Asimilación de malato	-	+	+	+
Asimilación de citrato	-	+	+	+
Asimilación de fenil-acetato	-	+	+	+
Citocromo oxidasa	+	+	+	+

ESTE TEXTO NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 20. PRUEBAS BIOQUÍMICAS COMPLEMENTARIAS PARA LA IDENTIFICACION DE GENEROS BACTERIANOS

CEPAS	Catalasa	Anaerobiosis	Crecimiento a 41 °C	Crecimiento con acetato	Movilidad
<i>Pseudomonas sp 1</i>	+	-	+	+	
<i>Pseudomonas sp 2</i>	+	-	+	+	
<i>Alcaligenes sp</i>	-	-	+	-	+

Los géneros bacterianos presentes en el cultivo mixto con anterioridad habían sido reportadas por otros investigadores, como degradadoras de BPC's:

- *Flavobacterium sp.* Es capaz de degradar diclorobifenilos y triclorobifenilos (Walia *et al*, 1988).
- *Pseudomonas sp.* Degrada diclorobifenilos, triclorobifenilos, tetraclorobifenilos, pentaclorobifenilos, hexaclorobifenilos y heptaclorobifenilos (Irving, 1996.; Walia *et al*, 1988; Sayler *et al* 1977).
- *Alcaligenes sp.* Es capaz de degradar diclorobifenilos, triclorobifenilos y pentaclorobifenilos (Walia *et al*, 1988 y Furukawa, 1976).

La degradación de BPC's realizada por las cepas de forma individual se desconoce, debido a que solo fue medida la degradación del cultivo en conjunto y no para cada una de éstas, sin embargo, es sabido que la utilización de cultivos mixtos propicia una mejor degradación de compuestos por la versatilidad de mecanismos enzimáticos que pueden desarrollar.

Por último cabe mencionar que las cepas aisladas de *Pseudomonas* podrían ser potencialmente patógenas por lo que es necesario su identificación hasta especie, antes de proponerlas como una opción para la biorremediación de algún sitio natural o urbano.

VIII. CONCLUSIONES.

1. El cultivo mixto aislado, formado por *Alcaligenes sp*, *Flavobacterium indologenes* y dos especies del género *Pseudomonas*, tiene la capacidad de degradar bifenilos policlorados, bajo condiciones controladas de temperatura, luz, agitación, oxígeno y nutrientes. Lo anterior confirma la hipótesis de trabajo planteada, al inicio de la investigación.
2. La utilización de bifenilo como cosustrato en este sistema mejoró la biodegradación de Aroclor 1260 de un 10% a un 27%.
3. La mayor degradación obtenida, resultó de la utilización del surfactante Biotrix, al obtener un 57% de disminución de Aroclor 1260 y determinándose que existía una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos.
4. La biodegradación obtenida al incorporar al surfactante Biotrix y al bifenilo como cosustrato fue de 47%.
5. La búsqueda de las mejores condiciones para la degradación de BPC's no puede ser concluida con los resultados obtenidos, debido a que quedan muchas incógnitas, las cuáles solo pueden ser resueltas mediante la continua experimentación.
6. Entre las actividades que deben realizarse, es primordial incorporar el cultivo mixto a suelo o agua contaminada bajo condiciones controladas, antes de llegar al objetivo perseguido a largo plazo que es, el de proporcionar una alternativa viable de solución a la contaminación por BPC's que sufren tanto ambientes naturales como urbanos.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- ABRAMOWICZ A. D., 1990, *Aerobic and Anaerobic Biodegradation of PCB's*. A Review, *Biotechnology*. Vol 10 No.3, pp. 241-251.
- ATLAS M. R., 1989, *Microbiology*, Ed. Maxwell MacMillan International, New York, pp. 807.
- BARRIAULT D. y Silvestre M., 1993, *Factors affecting PCB degradation by and implanted bacterial strains in soil microcosms*. *Can. J. Microbiol.* Vol. 39, pp. 594-602.
- BERNARD L. D., Unterman R., Bopp H. L., Brennan J. M., Haberl L., Johnson C., 1986, *Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls by Alcaligenes eutrophus H850*. *Applied and environmental microbiology*. Vol 53, pp. 1094-1102.
- BOUSER B., Nelson B., Pang W., Vang, M., 1996, *PCB's in our generation* . <http://bordeaux.uwaterloo.ca/assignment1/final.html> pp.1-6.
- BOYLE W. Alfred, Silvin J. Christopher, Hassett P. John, Nakas P. James y Tanenbaum S. W., 1992. *Bacterial PCB biodegradation*, *Biodegradation*. Vol. 3, pp.285-298.
- BRUNNER W., Sutherland F. H., Focht D. D., 1985, *Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil by analog enrichment and bacterial inoculation*. *J. Environment Quality*. Vol 14, pp324-328.
- CLARK R. R., Chian E. S. K., Griffin R. A., 1979, *Degradation of polychlorinated biphenyls by mixed microbial cultures*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 37, pp. 680-685.
- CHAPATWALA D. K., Babu V. R. G. y Nawaz S. M., 1992, *Degradation of acetonitrile and biphenyl compounds by a mixed microbial culture*. *Environmental toxicology and chemistry*. Vol. 11. pp. 1145-1151.
- CHATTERGEE D. K., Kilbane J. J. and Chakrabarty M. A., 1982, *Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 44, pp. 514-516.
- CHAUDHRY G. R., 1994, *Biological Degradation and Biorremediation*. Ed. DIOSCORIDES Press, U. S. A. pp. 33-73.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1996, *Toxicological profile for polychlorinated biphenyls*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Georgia. pp. 363.

DEPARTAMENTO DE SALUD DE NUEVA ZELANDIA, 1989, *Manejo Seguro de los BPC's*. Grupo Central de BPC's Contingente para Residuos Peligrosos. pp. 1-39.

DERCOVA K., Baláz S., Haluska L., Hornák V. y Holecová, 1994, *Degradation of PCB by bacteria isolated from long-time contaminated soil*. Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 58 pp. 337-348.

ENVIRONMENT CANADA, 1988, *Polychlorinated Biphenyls (PCB's), Fate and Effects in the Canadian Enviromen*. Canadá. pp. 27.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1978, *Microbiological Methods for Monitoring the Environment*. Cincinnati. pp. 338.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986, *Test Methods for Evaluating solid waste*. Third Edition. SW-846, "Florisil Column Cleanup" Method 3620. pp. 1-10.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986, *Test Methods for Evaluating solid waste*. Third Edition. SW-846, "Organochlorine Pesticides and PCB's" Method 8080. pp. 1-27.

FIEBIG R., Schulze D., Erlemann P., Slawinski M., Dellweg H., 1993, *Microbial degradation of polychlorinated biphenyls in contaminated soil*. Biotechnology Letters. Vol. 15, pp. 93-98.

FOCHT D. D. y Bronner W., 1985, *Kinetics of Biphenyl and polychlorinated biphenyl metabolisms in soil*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 50, pp. 1058-1063.

FOCHT D. D., 1995, *Strategies for the improvement of aerobic metabolisms of polychlorinated biphenyls*. Environmental Biotechnology. Vol. 6, pp. 341-346.

FURUKAWA K. Tonomura K., Kamibayashi A., 1979, *Metabolism of 2,4,4'-trichlorobiphenyl by Acinetobacter sp P6*. Agricultural and Biological Chemistry. Vol. 43, pp. 1577-1583.

FURUKAWA K., Matsumura F., 1976, *Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polichlorinated biphenyl components by Alkaliigenes sp*. Agric. Food Chem. Vol. 24, pp. 251-261.

FURUKAWA K., Tomizuka N. y Kamibayashi A., 1983, *Metabolic Breakdown of kanecolors (polychlorobiphenyls) and their products by Acinetobacter sp.* Applied and Environmental Microbiology. Vol. 46, pp. 140-145.

FURUKAWA Kensuke, 1982, *Biodegradation and detoxification of environmental pollutants.* CRC. Press U. S. A. pp. 33-57.

FURUKAWA, Kansuke, Matsumur, Fumio y Tonomura Kenzo, 1977. *Alcaligenes and Acinetobacter strains capable of degrading polychlorinated biphenyls.* Agricultural and Biological Chemistry. Vol. 42, pp. 543-548.

HADDOCK D. J., Nadim M. L., y Gibson T. D., 1993, *Oxidation of biphenyl by a multicomponent enzyme sistem from Pseudomonas sp strain LB400.* Journal of Bacteriology. Vol. 175, pp. 395-400.

HICKEY W. J., Searles D. B., Focht D. D., 1993, *Enhanced mineralization of polychlorinated biphenyls in soil inoculated whit chlorobenzoate-degrading bacteria.* Applied and Environmental Microbiology. Vol.59, pp. 1194-1200.

HILL D. L., Phelps T. J., Palumbo A. V., White D. C., Strandberg G. W., Donaldson T. L., 1989, *Bioremediation of polychlorinated biphenyls. Degradation capabilities in field lysimeters.* Appl. Biochem. Biotechnol. Vol. 20-21, pp 233-243.

HOET P. y Lauwreys, 1993, *Industrial Chemical Exposure.* 2da. edición, Lewis Publishing Inc., Londres. pp. 194-195.

HOOPER W. S., Prettigrew A. C., Sayles G., 1990. *Ecological fate, effects and prospects for the elimination of environmental toxicology and chemistry.* Vol 9, pp. 655-667.

HUTZINGER O. Safe S. y Zitko V., 1974, *The Chemistry of PCB's.* CRC Press, Cleveland.

JAWETZ E., Melnick L. y Adelberg, A., 1988, *Microbiología Médica.* Edit. El Manual Moderno, S.A. de C.V. 12ª edición, México, D.F. pp. 636.

JENSEN S, 1966, *Report of a new chemical hazard.* New Sci. Vol 32, pp.612.

JENSEN S, Renberg L. y Olsson M., 1972, *PCB Contamination From Boat Bottom Paint and Levels of PCB in Plankton Outside a Polluted Area.* Nature. Vol. 240, pp. 358-360

KIMBARA K., Hashimoto T., Fukuda M., Koana T., Takagi M., Oishi M y Yano K., 1988, *Isolation and characterization of a mixed culture that degrades PCB's.* Agricultural and Biological Chemistry. Vol.52, pp. 2885-2891.

KOHLER H. P. E., Kohler-Staub D., Focht D. D., 1988, *Cometabolism of polychlorinated biphenyls: enhanced transformation of Aroclor 1254 by growing bacterial cells*. Appl. Environ. Microbiol. Vol 54, pp 2683-2688.

KONG H. y Sayler G. S., 1983, *Degradation and total mineralization of monohalogenated biphenyls in natural sediment and bacterial culture*. Appl. Environ Microbiol. Vol. 46, pp. 666-672.

LAJOIE C. A., Layton A. C., Sayler G. S. 1994, *Cometabolic oxidation of polychlorinated biphenyls in soil with a surfactant-based field application vector*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 960, pp. 2826-2838.

LIU D., 1980, *Enhancement of PCB's biodegradation by sodium ligninsulfonate*. Water Res. Vol. 14, pp.1467-1475.

MASON, C. F. 1995. *Biology of Freshwater Pollution*, 2da. edición. Publishers Logman, Singapur, pp. 183-186.

O'LEARLY C. Hopper B. Has G., Giuseppin S.. 1996.. *The Chemistry of PCB's* [HTTP://bordeaux.uwaterloo.ca/signmen1/pcb-rep.html](http://bordeaux.uwaterloo.ca/signmen1/pcb-rep.html). pp. 1-7.

ODSJO T., 1973, *PCB in Some Swedish Terrestrial Organisms*. En: PCB Conference II. Estocolmo. Junta Nacional Sueca de Protección del Medio Ambiente. Publicación 4E. pp. 45-58.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1979, *Criterios de salud ambiental 2, Bifenilos y Trifenilos Policlorados*. pp. 1-86.

OTT M., Simons C. Parke D., Sorli G., 1996 *"The Chemistri of Polychlorinated Biphenyls (PCB's)"*. <http://bordeaux.uwaterloo.ca7/assignment/ott.html>. pp. 1-5

PELLIZARI H. V., Bezborodnikov S.; Quensen F. J. III, Tiedje M. J., 1996, *Evaluation of strains isolated by growth an naphthalene and biphenyl for hibridation of genes to dioxigenasa probes and polychlorinated biphenyls-degrading ability*. Applied and enviroment.

PRETTIGREW C. A., Breena., Corcoran C. y Sayler S. G., 1990, *Chlorinated biphenyl mineralization by individual populations and consortio of freshwater bacteria*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 56, pp. 2036-2045.

ROBERTS L. 1987. *Discovering microbes whit a taste for PCB's*. Science. Vol. 237, pp. 975-977.

ROMANOV V., Hausinger R. P. 1994. *Pseudomona aeruginosa* 142 uses a three-component ortho-halobenzoate 1,2-dioxygenase for metabolism of 2,4-dichloro- and 2-chlorobenzoate. Journal Bacteriology. Vol. 176, pp. 3368-3374.

SAYLER G. S.; Shon M. y Colwell R. R., 1977, *Growth of an estuarine Pseudomonas sp. on polychlorinated biphenyl*. Microbial Ecology. Vol. 3, pp. 241-255.

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA, 1995, *Bifenilos Policlorados (BPC's)*, Instituto Nacional de Ecología Dirección General de Residuos, Materiales y Riesgo. pp. 1-26.

SILVA S., Howard L., Merritt A. Siambani C. Valja S., 1996, *A proposal for a a PCB contaminated oil soil in the chesapeake bay area* bordeaux.uwaterloo.ca/biol447/assignment1/assign2/bio447.html. pp. 1-12

SUGIURA Katsura, 1992, *Microbial degradation of biphenyls in acuatic enviroments* Chemosfere. Vol. 47, pp. 881-890.

SULLIVAN. Jr. y Krieger G., 1992, *Hazardous Materials Toxicology*. Williams and Wilkins Publishing. Corp. Baltimore, U. S. A. pp. 748-751.

TULP M. TH. M., Shmitz R. y Hutzinger O., 1978, *The bacterial metabolisms of 4,4'diclorobiphenyl and its suppression by alternative carbon sources*. Chemosfere. Vol. 35, pp. 103-108.

VINEY I. y Bewley F. J., 1990, *Preliminary studies on the development of a microbiological treatment for polychlorinated biphenyls*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 19, pp. 789-796.

WALIA S., Tewari R., Brieger G., Thimm V. y McGuire T, 1988, *Biochemical and genetic characterization of soil bacteria degrading polychloridated biphenyl*. Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment. Editorial R. Abbou Elsevier Science Publishers B. V.

WHALE I., 1996 *Polychlorinated biphenyls (PCB's)*. <http://bordeaux.uwaterloo.ca/bio447/ignment1/pcbgroup/html>. pp. 1-8.

WOODYARD J. P., Weston R. F., 1989, *PCB detoxification technologies a critical assessment*. American Institute of Chemical Engineers. Summer Annual Meeting. pp. 1-8.

YAGI O. y Sudo R., 1980, *Degradation of PCB's by microorganisms*. Journal Water Pollutants. Control. Fed. Vol. 52, pp. 1035-1052.

ANEXO 1

Análisis de varianza

anova conc trata fact trata*fact

Number of obs = 70 R-squared = 0.2273
 Root MSE = 46.101 Adj R-squared = 0.1401

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	38770.2887	7	5538.61268	2.61	0.0201
trata	11405.8721	3	3801.95738	1.79	0.1585
fact	18335.6994	1	18335.6994	8.63	0.0046
trata*fact	11405.8721	3	3801.95738	1.79	0.1585
Residual	131768.604	62	2125.30006		
Total	170538.893	69	2471.57816		

oneway conc trata if fact==2

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	22100.0645	3	7366.68815	2.88	0.0526
Within groups	76863.2711	30	2562.10904		
Total	98963.3355	33	2998.98896		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(3) = 13.7418$ Prob> $\chi^2 = 0.003$

oneway conc trata if fact==2, means bonf

trata	Summary of conc Mean
1	110.64
2	75.208889
3	43.572857
4	53.986667
Total	72.456765

Comparison of conc by trata

(Bonferroni)

Row Mean	1	2	3
2	-35.4311 0.888		
3	-67.0671 0.080	-31.636 1.000	
4	-56.6533 0.145	-21.2222 1.000	10.4138 1.000

considerando un nivel de significancia 0.1

El procedimiento de Bonferroni.

Este es un procedimiento de comparación múltiple o procedimiento posterior, el cual es muy utilizado por su facilidad de aplicación, sólo requiere el uso de distribuciones t . Este procedimiento pretende controlar la posibilidad de error global para el experimento, reduciendo el nivel de significancia de F . El procedimiento de Bonferroni se puede usar también en pruebas de hipótesis sobre diferencias entre pares de medias poblacionales o para construir intervalos de confianza para las diferencias entre medias poblacionales.