



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

POR

RICARDO ALFÁN GUZMÁN
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

**EFFECTO DE COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS SOBRE
EL CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN MICROBIANA
AEROBIA**

Dirigida por

Dr. Luis Torres Bustillos



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 19:00 horas del día 29 del mes de octubre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:
Efecto de compuestos organoclorados sobre el crecimiento de una población microbiana aerobia

Presentada por el alumno:

Alfán Guzmán Ricardo
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 7 | 1 | 8 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dra. Ma. Guadalupe Ramírez Sotelo

Dra. Marina Olivia Franco Hernández



Dr. Jorge Issac Chairez Oria

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Dr. Edgar Salgado Manjarrez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 29 del mes octubre del año 2010, el que suscribe Ricardo Alfán Guzmán alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B0710856, adscrito a Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos y cede los derechos del trabajo intitulado “Efecto de compuestos organoclorados sobre el crecimiento de una población microbiana aerobia”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente direcciónl.torresB@ipn.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



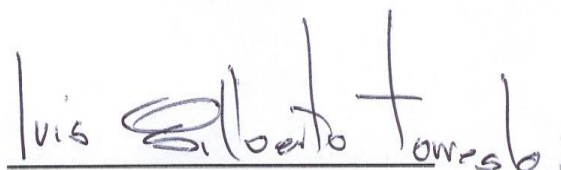
Ricardo Alfán Guzmán

Nombre y firma

Declaración de originalidad

“Yo Ricardo Alfán Guzmán declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde tengo conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a terceros es de mi propia autoría.

Declaro finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi director de tesis y mi comité tutorial en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita”



Vº Bº. Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

Wenn wir weinen, sind wir nichts als rührend,

Wo wir aschaunsin wir höchstens wach;

Unser Lächeln ist nicht weit verführend,

Und verführt es selbst, wer geht ihm nach?

Irgendeiner. Engel, klag ich, klag ich?

Doch wie ware den die Klage mein?

Ach, ich schreie, mit zwei Hölzern schalg ich

Und ich meine nicht, gehört zu sein.

Dass ich lärme, wird an dir nicht lauter,

Wenn du mich nicht fühltest, weil ich bin.

Leuchte, leuchte! Mach mich angeschauter

Bei den Sternen. Denn ich schwinde hin.

Rainer Maria Rilke

AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

Meinem lieben A.

A mis amigos.

Al Dr. Luis Torres por su incondicional apoyo.

RESUMEN

Los compuestos orgánicos clorados como el Tricloroetileno (TCE) y Diclorometano (DCM), entre otros, son disolventes empleados tanto de manera industrial como doméstica, llegan hasta las fuentes de agua al ser vertidos directamente o por filtración, causan severos daños a la salud, siendo el cáncer el más grave de ellos (Hiriart, 2005). Diversos países han establecido un nivel máximo de estos en aguas de uso doméstico, 5 $\mu\text{g/L}$ tanto para TCE, como para DCM (EPA, 2000); sin embargo, en México se sabe que algunas fuentes de agua doméstica exceden dicho umbral, ya que no se cuenta con una regulación estricta sobre estos.

Debido a esto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de estos compuestos organoclorados, TCE y DCM, sobre el crecimiento de una comunidad microbiana aerobia (Cultivo A) previamente expuesta a clorofenoles, con el fin de ser incorporada (en futuros estudios) como inóculo en sistemas de tratamiento de aguas (biofiltros) contaminadas con este tipo de compuestos.

Para tal efecto, se realizaron como primer paso microcosmos en donde el Cultivo A fue alimentado regularmente con cada disolvente (única fuente de carbono y energía) por separado y se observó hasta qué concentración éste era capaz de mantener su viabilidad. Posteriormente se realizaron ensayos cinéticos con una concentración inicial fija de cada disolvente (10 μM DCM Y 2 μM TCE, respectivamente). Como siguiente paso, se inoculó una columna de cristal (Volumen total, $V_T=0.35$ L; Volumen de operación, $V_o= 0.25$ L) empacada con tezontle (Díametro de partícula, $D_p=0.5$ cm) con el fin de inmovilizar a los microorganismos presentes en el Cultivo A y observar su comportamiento al hacer circular una corriente acuosa (Flujo de alimentación, $Q_A=0.0024$ Lmin^{-1}) que contenía 40 μM DCM (Velocidad de carga, $L=0.33\text{mg}_{\text{DCM}}\text{L}^{-1}\text{min}^{-1}$, para observar su potencial uso como sistema de biofiltración. Finalmente se tomaron muestras del tezontle colonizado y nuevamente se realizaron ensayos cinéticos en microcosmos con TCE en una concentración mayor, 10 μM , con el fin de comprobar si existía adaptación a la presencia de organoclorados. Ya que no se realizaron estudios cromatográficos, se realizó una simulación computacional del proceso de biodegradación de TCE, tomando como modelo a *Pseudomonas cepacia* G4. Con el fin de relacionar la simulación con los experimentos realizados, se propusieron dos condiciones de cultivo: oxidación directa, como hipotéticamente ocurriría en los experimentos de la sección 3.2, y cometabolismo, empleando como sustrato tolueno a fin de comparar ambos mecanismos.

Se concluyó que el Cultivo A, es capaz de crecer y mantener su viabilidad empleando como única fuente de carbono y energía, 10 μM DCM, por otra parte cuando al emplear 2 μM TCE, éste pierde viabilidad al cabo de 140 h de incubación. La inoculación de biofiltro fue exitosa tras la adición de

glucosa al sistema (y posterior reducción hasta 0.01 gL^{-1}) y el incremento de la concentración de DCM hasta $200 \text{ }\mu\text{M}$. Se observó que tras la exposición del Cultivo A a grandes concentraciones de DCM, este fue capaz de crecer y mantener su viabilidad al ser incubado con $10 \text{ }\mu\text{M}$ TCE (concentración cinco veces mayor a los microcosmos iniciales). La simulación permitió observar que los procesos de biodegradación aerobia de TCE son más eficientes cuando se llevan a cabo de manera cometabólica, obteniendo un 95% de remoción del contaminante.

ABSTRACT

Chlorinated organic compounds such as Trichloroethylene (TCE) and dichloromethane (DCM), among others, are solvents used as both for industrial and domestic purposes, they reach water sources through direct discharge or by filtration, causing severe damage to health, being cancer the most serious (Hiriart, 2005). Several countries have set a maximum level of those in domestic waters, $5 \mu\text{g} / \text{L}$ for both TCE and for DCM (EPA, 2000), but in Mexico it is known that some domestic water supplies exceed this threshold, due to the lack of strict regulation.

Because of the previously mentioned reasons, the present research had as main objective to evaluate the effect of these chlorinated compounds, TCE and DCM, on the growth of an aerobic microbial community (Culture A) previously exposed to chlorophenols, in order to be incorporated (in future studies) as inoculum in water treatment systems (biofilters).

For this purpose, several experiments were conducted. As first step, Culture A was incubated in microcosms, fed regularly with each solvent (as a sole carbon source) separately and the highest concentration in which it was able to maintain its viability was determined. Kinetic assays were then held with a fixed initial concentration of each solvent ($10 \mu\text{M}$ DCM and $2 \mu\text{M}$ TCE, respectively). As a next step, a glass column (Total volume, $V_T = 0.35 \text{ L}$; Packed volume, $V_o = 0.25 \text{ L}$) was packed with volcanic rock (particle diameter, $D_p = 0.5 \text{ cm}$) and a water stream containing Culture A and $40 \mu\text{M}$ DCM was fed, to immobilize the microorganisms in it (Flow rate, $Q_A = 0.0024 \text{ Lmin}^{-1}$; Loading rate, $L = 0.33 \text{ mgDCML}^{-1}\text{min}^{-1}$) in order to observe its potential use as biofiltration system. Finally, samples of volcanic rock were extracted from the packed column, then kinetic assays were performed in microcosms with TCE at a higher concentration, $10 \mu\text{M}$ (5-fold greater than in the previous assays), to see if there was adaptation to the presence of chlorinated compounds. Because no chromatographic analysis was conducted, a computer simulation of TCE biodegradation process was performed, using *Pseudomonas cepacia* G4 a model microorganism. To relate the simulation with the previous experiments, two incubation conditions were set: direct oxidation, as hypothetically occurred in the actual experiments and cometabolism, using toluene as a co-substrate to compare both.

It was concluded that Culture A is able to grow and maintain its viability using as a sole carbon source $10 \mu\text{M}$ DCM, on the other hand, when fed with $2 \mu\text{M}$ TEC it loses viability after 140 h of

incubation. The inoculation of the packed column (biofilter) was successful after the addition of glucose to the system (10 gL^{-1} and subsequent reduction to 0.01 gL^{-1}) and increased the concentration of DCM up to $200 \text{ }\mu\text{M}$. It was demonstrated that after the exposure of Culture A to high concentrations of DCM, it was able to grow and maintain viability when incubated with $10 \text{ }\mu\text{M}$ TCE (5-fold greater than in the initial microcosm). The simulation showed that the process of aerobic biodegradation of TCE is more efficient when carried out in a cometabolic way, obtaining a removal rate of 95%.

Índice general

| | Página |
|---|--------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Compuestos organoclorados | 1 |
| 1.1.1 Fuentes naturales e industriales de organoclorados | 3 |
| 1.1.2 Tricloretileno | 4 |
| 1.1.3 Diclorometano | 5 |
| 1.2. Mecanismos de biodegradación de compuestos organoclorados | 6 |
| 1.2.1 Biodegradación aerobia de compuestos organoclorados | 9 |
| 1.2.1.1 Oxidación directa | 9 |
| 1.2.1.2 Cometabolismo | 11 |
| 1.3 Sistemas de tratamiento de organoclorados | 13 |
| 1.3.1 Biofiltración | 13 |
| 1.4 Justificación | 18 |
| 2. Objetivos | 19 |
| 2.1 Generales | 19 |
| 2.2 Particulares | 19 |
| 3. Metodología | 20 |
| 3.1 Aclimatación del “Cultivo A” a la presencia de TCE y DCM | 21 |
| 3.2 Cinética de crecimiento del “Cultivo A” con DCM y TCE como única fuente de carbono | 21 |
| 3.3 Operación del biofiltro enriquecido con el “Cultivo A” | 21 |
| 3.4 Cinéticas de crecimiento con muestras del biofiltro | 24 |
| 3.5 Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE | 24 |
| 4 Resultados | 26 |
| 4.1 Aclimatación del “Cultivo A” a la presencia de TCE y DCM | 26 |
| 4.2 Cinéticas de crecimiento del “Cultivo A” con DCM Y TCE como única fuente de carbono | 27 |
| 4.3 Operación del biofiltro enriquecido con el “ Cultivo A” | 29 |
| 4.4 Cinética de crecimiento con muestras del biofiltro aclimatado a DCM | 33 |
| 4.5 Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE | 34 |
| 5. Análisis de resultados | 36 |
| 5.1 Aclimatación del “Cultivo A” a la presencia de TCE y DCM | 36 |
| 5.2 Cinéticas de crecimiento del “Cultivo A” con DCM y TCE como única fuente de carbono | 37 |

| | |
|---|----|
| 5.3 Operación del biofiltro enriquecido con el “ Cultivo A” | 38 |
| 5.4 Cinética de crecimiento con muestras del biofiltro aclimatado a DCM | 41 |
| 5.5 Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE | 42 |
| 6. Conclusiones y recomendaciones | 43 |
| 7.Referencias | 45 |

Índice de tablas

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Niveles máximos de contaminantes (NMC) orgánicos en agua potable | 2 |
| Tabla 2. Organoclorados utilizados en la industria | 3 |
| Tabla 3. Clasificación de bacterias involucradas en la biodegradación de organoclorados | 7 |
| Tabla 4. Mecanismo de biodegradación de organoclorados | 8 |
| Tabla 5. Clasificación de los biofiltros en función de la fase líquida y biológica | 14 |
| Tabla 6. Ventajas y desventajas del uso de biofiltros y biolavadores | 16 |
| Tabla 7. Cambios en la concentración de glucosa y DCM en el biofiltro | 23 |
| Tabla 8. Valores de los parámetros de la Ecuación 1 | 25 |
| Tabla 9. Incremento de la concentración de disolventes en el medio durante el tiempo de incubación. | 26 |
| Tabla 10. Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE | 35 |

Índice de figuras

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Disolventes organoclorados. | 1 |
| Figura 2. Tricloroetileno (TCE). | 4 |
| Figura 3. Diclorometano (DCM) | 5 |
| Figura 4. Oxidación (directa) de organoclorados | 9 |

| | |
|--|----|
| Figura 5. Biodegradación aerobia de CV (oxidación directa). | 10 |
| Figura 6. Ruta de biodegradación de DCM por <i>Methylphilus sp.</i> | 11 |
| Figura 7. Biodegradación aerobia de organoclorados por cometabolismo | 12 |
| Figura 8. Mecanismos de acción de las monooxigenasas | 12 |
| Figura 9. Biofiltro de lecho fijo | 15 |
| Figura 10. Biofiltro | 23 |
| Figura 11. Efecto de organoclorados sobre el "Cultivo A" | 26 |
| Figura 12. Cinética de crecimiento con DCM y TCE como únicas fuentes de carbono | 27 |
| Figura 13. Segunda cinética de crecimiento con DCM y TCE como únicas fuentes de carbono | 28 |
| Figura 14. Colonización del soporte a diferentes tiempos y condiciones de operación | 30 |
| Figura 15. Micrografías del soporte colonizado (biopelícula) tomadas al microscopio de barrido de electrones | 32 |
| Figura 16. Cinética de crecimiento empleando soporte del biofiltro como inóculo | 33 |
| Figura 17. Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE | 34 |

Abreviaciones

| | |
|------------------|---|
| AMO | Amonio monooxigenasa |
| BLE | Biofltro de lecho escurrido |
| BLF | Biofiltro de lecho fijo |
| CF | Cloroformo |
| Cl- | Ion cloruro |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| COV | Compuestos orgánicos volátiles |
| CT | Tetracloruro de carbono |
| CV | Cloruro de vinilo |
| 1,1-DCE | 1, 1 dicloroetileno |
| c-DCE | cis- dicloroetileno |
| t- DCE | trans- dicloroetileno |
| DCM | Diclorometano |
| DNAPL | Fases líquidas no acuosas (densidad mayor a la del agua) |
| DQO | Demanda química de oxígeno (mgL ⁻¹) |
| EPA | Agencia de protección al ambiente, E.U.A. |
| GSH | Glutación |
| H ₂ S | Sulfuro de hidrógeno |
| HRT | Tiempo de retención hidráulico (min) |
| INE | Instituto Nacional de Ecología, México |
| L | Velocidad de carga (mgL ⁻¹ min ⁻¹) |
| LNAPL | Fases líquidas no acuosas (densidad menor a la del agua) |
| MMO | Metano monooxigenasa |
| MTBE | Metil terbutil eter |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| NAPL | Fases líquidas no acuosas |

| | |
|-------|--|
| NIOSH | Instituto nacional para la seguridad ocupacional y salud, E.U.A. |
| OSHA | Agencia europea para la seguridad y salud en el trabajo |
| PCE | Percloroetileno |
| SSV | Sólidos suspendidos volátiles |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |

1. Introducción

1.1 Compuestos organoclorados

De los diversos contaminantes encontrados en el agua subterránea, los orgánicos representan el mayor riesgo por sus efectos en el ambiente y en la salud humana. Dentro de este grupo de compuestos, los solventes industriales y los hidrocarburos aromáticos derivados del petróleo se encuentran principalmente en agua subterránea. Muchos de los problemas de contaminación ocurren por fugas, derrames y disposición de líquidos orgánicos inmiscibles en la superficie del agua, los cuales se describen como *fases líquidas no acuosas* (NAPL, por sus siglas en inglés). Estos fluidos inmiscibles pueden clasificarse en dos categorías: aquellos cuya densidad es mayor a la del agua -DNAPL-, que incluyen a los disolventes organoclorados como percloroetileno (PCE) y tricloroetileno (TCE), sustancias como creosota, bifenilos policlorados y algunos plaguicidas; y aquellos más ligeros que el agua -LNAPL-, que incluyen compuestos como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (Hiriart, 2005).

Los disolventes organoclorados (Figura 1) son sustancias volátiles ampliamente usadas como desengrasante en la industria metalúrgica, tintorerías, producción de tintas, plásticos y textiles. Debido a sus características, las sustancias LNAPL generalmente se distribuyen cerca de la fuente contaminante y son degradados por bacterias en un medio aerobio. No sucede así con los DNAPL, que son muy persistentes, se transportan en forma descendente y aun cuando presentan una baja solubilidad, las concentraciones a las que se detectan en agua sobrepasan las normas de calidad del agua potable en países como Estados Unidos y Canadá. Las zonas en las que se encuentra DNAPL estancado en la superficie pueden representar una fuente significativa de contaminación a largo plazo, a menos que sean eliminados, pero la remoción completa, en especial de los organoclorados, no es posible con la tecnología que existe en la actualidad (Hiriart, 2005).

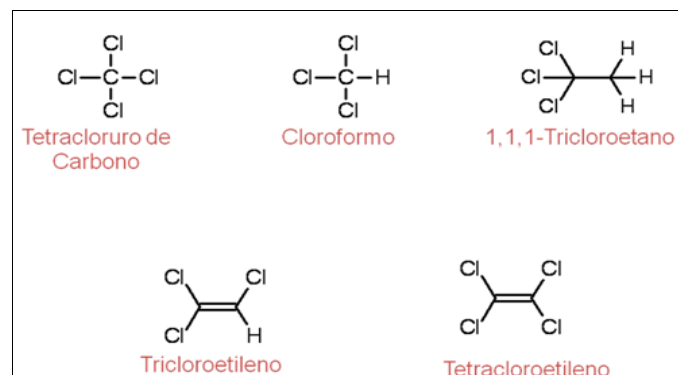


Figura 1. Disolventes organoclorados.

Estos compuestos, encontrados en diferentes tipos de aguas, se originan en actividades urbanas e industriales. Por lo tanto, los lugares con aguas contaminadas se localizan cerca de áreas industrializadas, densamente pobladas, circunstancia que incrementa la posibilidad de exposición humana (Patrick,1987). Por ejemplo, el PCE y TCE producen depresión del sistema nervioso central, afectan la función del hígado y riñón, dependiendo de la concentración y tiempo de exposición. Se sabe que el tetracloruro de carbono (CT) y el cloroformo (CF) son cancerígenos (Lyon International Agency for Research on Cancer, 1995).

Dado el elevado riesgo a la salud que estos representan, muchos países, entre ellos Estados Unidos, han procurado legislar sobre su uso y disposición (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles máximos de contaminantes (NMC) orgánicos en agua potable (EPA, 2000).

| Contaminante | NMC (mg/L) | Daño potencial a la salud |
|---------------------|-----------------------|---|
| Clorobenceno | 0.1 | Hígado y riñón. |
| Diclorometano | 0.005 | Hígado, riñón e incrementa el riesgo de padecer cáncer. |
| Hexaclorobenceno | 0.001 | Hígado, riñón e incrementa el riesgo de padecer cáncer, reducción de la capacidad reproductiva. |
| Tricloroetileno | 0.005 | Hígado, riñón e incrementa el riesgo de padecer cáncer. |
| Cloruro de vinilo | 0.002 | Incrementa el riesgo de padecer cáncer. |

1.1.1 Fuentes naturales e industriales de organoclorados

En la naturaleza se producen más de 4 000 especies de compuestos orgánicos halogenados, la mitad de ellos son organoclorados. Estos son producidos por organismos marinos (corales, esponjas, medusas, algas), semillas, plantas, hongos y líquenes, entre otros. En ambientes marinos anualmente se producen aproximadamente 5 millones de toneladas de cloruro de metilo y un número igualmente considerable de otros compuestos altamente clorados como CF y CT. Es sabido que algunas algas marinas son capaces de producir aproximadamente 400 diferentes tipos de organoclorados; por otra parte, existen reportes de producción de TCE y PCE en especies de fitoplancton, este fenómeno juega un papel importante en la supervivencia de tales organismos. Incluso se ha detectado la presencia de compuestos clorados con estructuras mucho más complejas producidos naturalmente como bifenilos policlorados o tetraclorodibenzodioxinas en sedimentos con una antigüedad de 8 000 años (Eurochlor, 2005).

Sin embargo, la principal fuente de contaminación de cuerpos de agua es la industria. En la Tabla 2 se presenta una lista de los principales organoclorados empleados en actividades industriales, así como su uso específico.

Tabla 2. Organoclorados utilizados en la industria (EPA, 2000).

| Nombre | Nombre común | Abreviación | Observaciones |
|-------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| Tetracloroetileno | - | PCE | Solvente |
| Tricloroetileno | - | TCE | Solvente, producto de la degradación de PCE |
| Dicloroeteno | Dicloruro de acetileno | 1-1/Cis/ trans-DCE's | Solvente, producto de la degradación de PCE y TCE |
| Cloroeteno | Cloruro de vinilo | CV | Desecho de la producción de cloruro de polivinilo |
| Tetraclorometano | Tetracloruro de carbono | CT | Solvente, desecho de extintores |
| Triclorometano | Cloroformo | CF | Solvente, desecho de anestésicos |
| Diclorometano | Cloruro de metileno | DCM | Solvente |

En el presente estudio nos enfocaremos en dos de estos compuestos específicamente, Tricloroetileno (TCE) y Diclorometano (DCM). En las siguientes secciones se profundizará en las propiedades, daños a la salud y procesos de biodegradación de los mismos.

1.1.2 Tricloroetileno

Uno de los organoclorados más importantes debido a su abundancia e impacto en la salud es el tricloroetileno (Figura 2), presente en productos de uso común como correctores líquidos para máquinas de escribir, removedores de pintura, adhesivos y líquidos limpia-alfombras (Lyon International Agency for Research on Cancer, 1995). La mayor parte de los productos de uso común que contienen TCE se encuentran al 99%, pudiendo ser el 1% restante epoxibutano como estabilizante (Goeptar, 1995). Llega al medio ambiente sin sufrir prácticamente ninguna modificación en su estructura, la mayor parte de este se evapora y una pequeña porción permanece tanto en el agua industrial como en la doméstica (German Chemical Society, 1994).

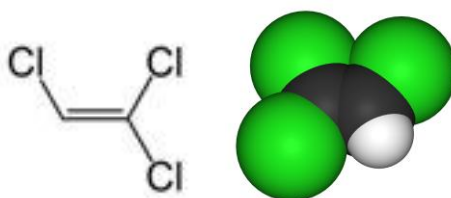


Figura 2. Tricloroetileno (TCE).

El TCE causa graves daños a la salud, como daño hepático, renal y al SNC (EPA, 2000), edema pulmonar, cloro-acné, mareo y pérdida de la conciencia, entre otros. Además se han realizado bioensayos en ratones expuestos a TCE por inhalación o administración oral, resultando en el incremento de la incidencia de carcinoma hepatocelular, tumores pulmonares y adenomas tubulares de riñón (Henschler, 1984). Asociaciones como la Agencia Europea para la Seguridad y Salud en el Trabajo (OSHA), el Instituto Nacional para la Seguridad Ocupacional y Salud (NIOSH, E.U.A.) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA, E.U.A.) consideran al TCE y otros cloroetenos altamente carcinogénicos.

En México también es ampliamente usado; sin embargo, no existe ninguna regulación sobre el contenido de este en aguas de uso doméstico. Se han reportado concentraciones entre 0.1 µg/L- 23.5 µg/L de compuestos altamente clorados, entre ellos el TCE, en aguas nacionales (Hiriart, 2005), cifras que rebasan las normas internacionales de 5 µg/L. En el año 2003 se planteó un anteproyecto de NOM para regular su presencia en aguas domésticas, permitiendo una

concentración máxima de 70 mg/L, diez veces por arriba de la establecida por la EPA, sin ser aprobado hasta la fecha (PROYECTO NOM-SSA-XXX).

Aunque muchos gobiernos ya cuentan con regulación oficial de este tipo de compuestos, algunas organizaciones internacionales que pretenden elevar la calidad de los procesos industriales, como ISO-14000, tampoco cuentan con regulación estricta sobre cloroetenos (Eurochlor, 2005).

1.1.3 Diclorometano

Este organoclorado (Figura 3) es un disolvente incoloro de olor dulce similar al del cloroformo. Al igual que el TCE es ampliamente usado como removedor de pinturas, también es empleado como agente fumigante en campos de fresas y algunos granos y como solvente de extracción en la industria alimenticia y en la industria farmacéutica en procesos de purificación y aislamiento de intermediarios (EPA, 2000, Eurochlor, 1999). A diferencia del TCE, se volatiliza con mayor facilidad (Coeficiente de la Ley de Henry $270 \text{ Pam}^3 \text{ mol}^{-1}$ a 20°C), por lo que generalmente se le considera un contaminante del aire; sin embargo, no se descartan los estragos que ocasiona a la vida marina y a humanos debido a que su permanencia en cuerpos acuáticos es de aproximadamente 35-45 días (Eurochlor, 1999).

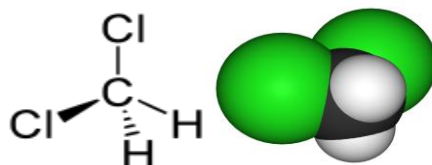


Figura 3. Diclorometano.

Al igual que muchos organoclorados, su exposición y consumo accidental está relacionado con la proliferación de distintos tipos de cáncer, principalmente carcinomas hepáticos, así como de necrosis, inflamación granulomatosa (National Institute of Environmental Health Sciences, USA, 1986). El límite máximo permitido en aguas de consumo doméstico de acuerdo a la EPA, 2000 es de $5 \mu\text{g/L}$; sin embargo, en México no se cuenta con regulación sobre su emisión en cuerpos acuáticos, solo se ha legislado su emisión a la atmósfera, como NOM-121-SEMARNAT-1997 sobre las emisiones de COV's provenientes de operaciones de recubrimiento de carrocerías, permitiendo un emisión de entre $55-75 \text{ g/m}^2$.

1.2 Mecanismos de biodegradación de compuestos organoclorados

En la actualidad existen diversos métodos físico-químicos destinados a la degradación o recuperación de contaminantes en suelos y agua; no obstante, las técnicas biológicas han mostrado ser una opción viable en la limpieza de sitios contaminados, ya que los costos de operación se reducen en comparación con las técnicas químicas, no requieren procesos de extracción o excavación en la mayoría de los casos y públicamente son más aceptados porque se conciben como técnicas naturales (EPA, 2000).

En cuanto a la biodegradación de organoclorados, existe una amplia variedad de organismos capaces de llevar a cabo este proceso, obteniendo como productos finales compuestos menos dañinos o incluso llegar a la mineralización total del contaminante. Centraremos nuestra atención en los sistemas bacterianos, ya que son los más estudiados y aquellos que han mostrado mayor eficiencia de biodegradación. Dentro de estos procesos de biodegradación de compuestos organoclorados es posible distinguir dos mecanismos principales:

- Aerobio: oxidación directa o cometabólica
- Anaerobio: dehalogenación reductiva directa o cometabólica

Ambos mecanismos ocurren naturalmente bajo condiciones propias del medio; sin embargo, la adición de diferentes sustancias como aceptores o donadores de electrones favorece la biodegradación (EPA, 2000). En los mecanismos directos, los microorganismos obtienen energía y se reproducen gracias a la utilización de los organoclorados; por otra parte, en el cometabolismo estos son degradados por alguna enzima o cofactor producidos durante el metabolismo de otro compuesto sin obtener ningún tipo de beneficio energético o de crecimiento (EPA, 2000). En general, los compuestos altamente clorados (PCE, TCE) se degradan con mayor facilidad bajo condiciones anaerobias, mientras que la biotransformación de aquellos con menor número de Cl en su estructura (DCE, DCM, CV) se facilita en aerobiosis (DiStefano, 1991).

Las bacterias involucradas comúnmente en la degradación de organoclorados son quimiótrofas (obtención de energía por medio de reacción de oxidación-reducción) y utilizan compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Sin embargo, bacterias litótrofas (utilización de compuestos inorgánicos como donadores de electrones) y autótrofas (utilización de CO₂ como fuente de carbono) también están involucradas en la biodegradación de disolventes clorados (EPA, 2000).

En la Tabla 3 se presenta la clasificación de las bacterias involucradas en la biodegradación de organoclorados de acuerdo al tipo de aceptor de electrones que emplean.

Tabla 3. Clasificación de bacterias involucradas en la biodegradación de organoclorados (EPA, 2000).

| Dominancia (determinada por la generación relativa de energía) | Bacteria | Mecanismo de biodegradación | Potencial redox aproximado (volts) a pH 7 |
|---|---------------------------------|--|--|
| Más dominante | <i>Oxidantes</i> | Aerobio | +0.82 |
| | Reductoras de nitratos | Anaerobio | +0.74 |
| | Reductoras de manganeso (IV) | | +0.52 |
| | Reductoras de hierro (III) | | -0.05 |
| | Sulfato- reductoras | | -0.22 |
| | Metanogénicas | | -0.24 |
| Menos dominante | | | |

Aunque es posible llevar a cabo la biodegradación de organoclorados bajo condiciones de anaerobiosis, como se mencionó anteriormente, en este estudio nos enfocaremos únicamente a los procesos aerobios. La Tabla 4 presenta un resumen de diferentes bacterias y sus mecanismos de biodegradación y algunas características de estos.

Tabla 4. Mecanismo de biodegradación de organoclorados.

| Mecanismo de biodegradación | Organoclorado | Condición | Bacteria reportada | Datos cinéticos | Producto | Fuente |
|-----------------------------|------------------|---|--|---|-----------------|---|
| Directo | DCE, CV | Aerobio | No reportado | Michaelis-Menten de 2° orden ($V_{max}=5.1$ y $12.4 \mu\text{mol/Ldía}$ para DCE y CV respectivamente) | CO ₂ | Bradley and Chapelle, 1998 |
| | DCE, CV, CM, DCM | | No reportado | No reportado | CO ₂ | RTDF, 1997 |
| | c-DCE | | Relacionado con <i>Polaromonas vacuolata</i> | No reportado | - | Coleman, 2002 |
| | DCM | | <i>Hyphomicrobium</i> sp. DM2 <i>Methylobacterium</i> sp. DM4 | No reportado | Formaldehido | Martínez-Zayas y Leish, 2005; Trotsenko, 2009 |
| Cometabólico | TCE | Aerobio, donador de electrones (BTEX) | <i>Burkholderia cepacia</i> G4 | No reportado | CO ₂ | Munakata-Marr, 1997; McCarty, et al, 1999 |
| | TCE | Aerobio, donador de electrones (tolueno) | No reportado | Primer orden 0.26-0.4 mol/día | - | Petrovski, et al, 1997 |
| | TCE, c-DCE, CV | Aerobio donador de electrones (alcohol bencílico) | Cultivo mixto no identificado | No reportado | - | Tejasen, 2004 |

1.2.1 Biodegradación aerobia de compuestos organoclorados

En regiones donde existe la presencia de oxígeno, algunos organoclorados pueden ser oxidados a CO_2 , agua y Cl^- directamente o por cometabolismo (Hartmans, 1992). La oxidación directa ocurre preferentemente y con mayor frecuencia cuando se trata de compuestos con bajo número de Cl^- en su estructura, mono y diclorados (DiSteffano, 1991), mientras que la oxidación incidental de compuestos con mayor número de Cl^- en su estructura (PCE o TCE) ocurre con menor frecuencia de manera cometabólica; en este caso, los microorganismos responsables de ella no obtienen ningún beneficio de tal proceso. Además está reportado que la oxidación directa es un proceso que ocurre en menor tiempo que el cometabolismo (Samprini, 1994).

1.2.1.1 Oxidación directa

En este tipo de mecanismo los organoclorados (Figura 4) son empleados como donadores de electrones y como única fuente de carbono. Los electrones generados por la oxidación de estos compuestos son transferidos a un aceptor como el oxígeno (EPA, 2000).

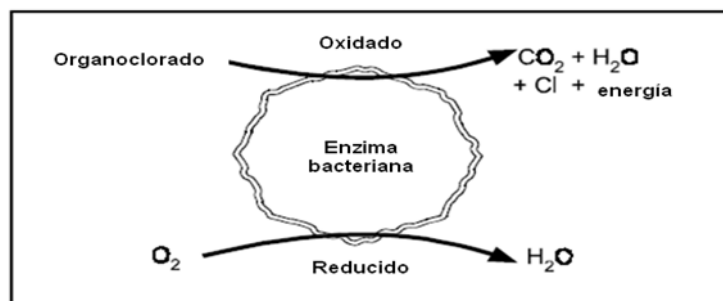


Figura 4. Oxidación (directa) de organoclorados (modificado de Hartmans, 1992).

Con el fin de ilustrar este mecanismo, mostraremos la ruta de biodegradación de cloruro de vinilo y diclorometano.

El cloruro de vinilo (CV) es uno de los organoclorados más tóxicos presentes en aguas contaminadas y está ampliamente relacionado con la biodegradación anaerobia de PCE o TCE. Ya que cuenta con un bajo número de Cl^- en su estructura, su biodegradación ha sido estudiada en sistemas aerobios, donde funge como única fuente de carbono (Davis y Carpenter, 1999).

La oxidación de CV se lleva a cabo de manera intracelular y tiene como productos al cloroxirano (epóxido altamente inestable, identificado como el paso limitante de la biodegradación por su alto nivel de toxicidad), ácido fórmico, oxiglicólico y finalmente CO₂ y agua (Hartmans y DeBont, 1992); este proceso resulta en una ganancia energética para el microorganismo. En la Figura 5 se muestra la ruta de biodegradación de CV. Algunos microorganismos relacionados con la biodegradación aerobia de CV son *Burkholderia cepacia* G4 y *Mycobacterium aurum*.

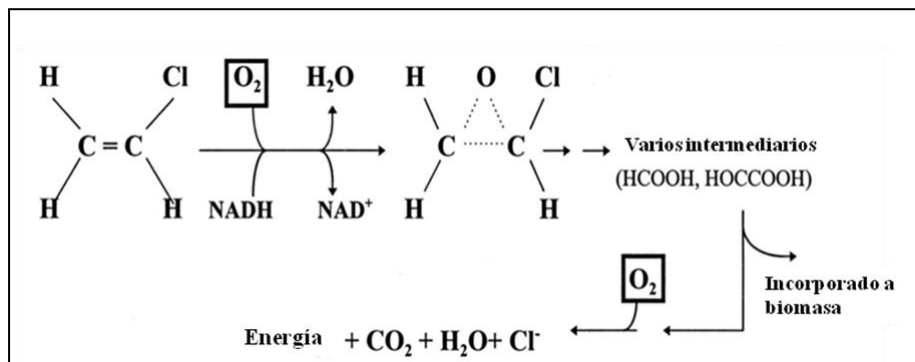


Figura 5. Biodegradación aerobia de CV por oxidación directa (modificado de Kielhorn, 2000).

Estudios recientes han mostrado que el segundo paso, posterior a la formación del epóxido, es la catálisis de este gracias a la enzima *epoxialcano coenzima M transferansa*, esta degrada al epóxido formando un 2-hidroxietil aducido a la coenzima M (Field, 2004). La degradación de CV como única fuente de carbono y energía está asociada estequiométricamente a la liberación de iones cloruro, como se mencionó anteriormente (Field, 2004), CV radiomarcado es convertido a ¹⁴C (Field, 2004), indicando una intensa mineralización de este compuesto.

Se ha reportado que algunos metilótrofos como *Methylophilus* sp. DM11, *Hyphomicrobium* sp. DM2 y *Methylobacterium* sp. DM4 son capaces de utilizar DCM como única fuente de carbono (Figura 6), en este proceso participa la enzima DCM-dehidrogenasa, que media la sustitución dependiente de glutatión (GSH), obteniendo así cloro inorgánico (Cl⁻) y formaldehído, este último es el metabolito principal para el crecimiento de dichos microorganismos; sin embargo, la ruta no ha sido perfectamente elucidada (Martínez-Zayas y McLeish, 2005, Trotsenko, 2009).

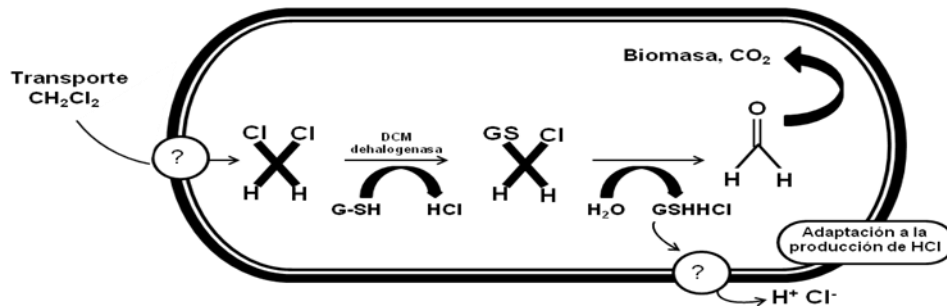


Figura 6. Ruta de biodegradación de DCM por bacterias metilótrofas (modificado de Trotsenko, 2009).

Por otra parte, se ha reportado que bacterias como *Pseudomonas sp.* LP son capaces de utilizar DCM como única fuente de carbono; sin embargo, presentan inhibición en el crecimiento cuando son expuestas a concentraciones mayores que 0.1 mM (Reineke y Agathos, 2002).

1.2.1.2 Cometabolismo

La oxidación vía cometabolismo (Figura 7) es un proceso en el que los organoclorados son transformados a compuestos más sencillos de manera fortuita, estos son oxidados por una enzima o un cofactor producidos durante el metabolismo de otro compuesto, sin que los microorganismos en los que se lleva a cabo obtengan algún beneficio energético o de crecimiento (EPA, 2000). La biodegradación cometabólica requiere invariablemente presencia de donadores de electrones como el metano, propano, eteno, etano o hidrocarburos aromáticos como fenol o tolueno (Tejasen, 2004).

En 1998 Wilson y Wilson reportaron por primera vez que organoclorados como el TCE podían ser biodegradados aeróbicamente en suelos con presencia de bacterias metanotróficas y enriquecidos con metano y oxígeno. Estudios posteriores revelaron que la enzima *metano-monooxigenasa* (MMO) era la responsable de catalizar la oxidación de TCE (Álvarez-Cohen, McCarty, 1997; Henry, 1994). Otras oxigenasas como la amonio-monooxigenasa (AMO) o la toluen-monooxigenasa también han mostrado capacidad de oxidar organoclorados (Arciero, 1989; Rasche, 1991; Heald, 1994).

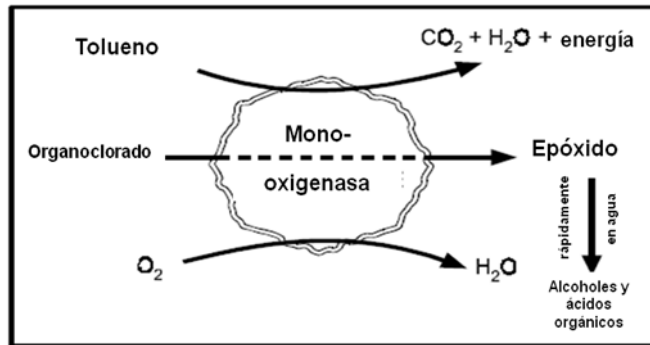


Figura 7. Biodegradación aerobia por cometabolismo de organoclorados (modificado de McCarty, 1998).

Estas enzimas oxidativas catalizan la reacción que incorpora O₂ a los organoclorados (Figura 10), dicha oxidación requiere de una molécula energética como la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) para incorporar O₂. Las monooxigenasas carecen de la habilidad de distinguir CH₄, NH₃, tolueno o algún organoclorado. Esta falta de especificidad resulta en la incorporación de oxígeno en la molécula de los organoclorados, formando así un epóxido inestable (Álvarez-Cohen, 1991), dicha molécula será espontáneamente degradada a ácidos como el tri o dicloroacético, estos son solubles en agua y serán degradados a CO₂, Cl⁻ y agua (Figura 8).

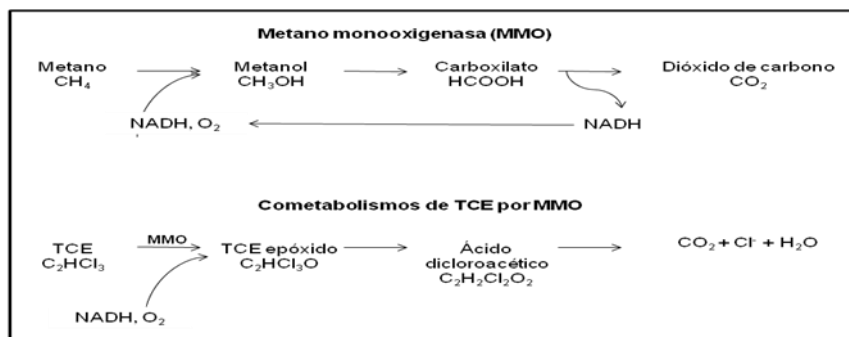


Figura 8. Mecanismos de acción de las monooxigenasas (EPA, 2004).

1.3 Sistemas de tratamiento de organoclorados

Existen diferentes sistemas para llevar a cabo la biodegradación de compuestos volátiles halogenados, tanto en corrientes líquidas como gaseosas. En esta sección se hará una revisión enfocada a los sistemas de biofiltración.

1.3.1 Biofiltración

La biofiltración se define como todo proceso biológico utilizado para el control o tratamiento de compuestos volátiles orgánicos e inorgánicos presentes en la fase gaseosa. En la biofiltración, los microorganismos son los responsables de la degradación biológica de los contaminantes volátiles contenidos en corrientes de aire residual (Devinny, 1999).

Durante el proceso de biofiltración, el aire contaminado pasa a través de los espacios intraparticulares del material filtrante. La degradación de los contaminantes ocurre previa transferencia del aire a un medio líquido en donde es utilizado como fuente de carbono y energía (compuestos orgánicos) o como fuente de energía (compuestos inorgánicos). La utilización implica producción de biomasa y la oxidación parcial o total del contaminante. A su vez, la biomasa, bajo ciertas condiciones, sufre una oxidación por respiración endógena. De esta manera, los procesos de biofiltración dan lugar a una descomposición completa de los contaminantes, creando productos no peligrosos. Los primeros reportes del uso de los sistemas de biofiltración datan de 1923 y se utilizaron para remover el azufre (H_2S) proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales. Los primeros biofiltros fueron sistemas abiertos en los que se empleaba suelo poroso como soporte. En la década de 1970, los nuevos diseños de biofiltros permitieron mayores cargas de olores y compuestos volátiles (Ottengraf, 1986). Posteriormente, a nivel laboratorio, el estudio de la biofiltración permitió hacer de esta una tecnología versátil para el control de diversos compuestos orgánicos volátiles (COV), como son los compuestos halogenados, no halogenados, alifáticos, aromáticos, compuestos que contienen azufre (H_2S). Entre estos compuestos están los orgánicos como alcoholes, cetonas, alcanos, derivados del benceno y compuestos clorados (ej. DCM). Con el avance del estudio en la biofiltración, la lista de los compuestos que pueden ser tratados mediante esta tecnología fue aumentando hasta incluir algunos compuestos que alguna vez fueron considerados como difícilmente biodegradables, como el metil tert butil éter (MTBE), un compuesto oxigenado presente en las gasolinas reformuladas (INE, 2005).

Los equipos empleados para la purificación biológica de gases pueden subdividirse en tres tipos: biofiltro de lecho fijo (BLF), biofiltro de lecho escurrido (BLE) y biolavadores (BL). Esta clasificación se basa en las condiciones en las que se encuentran los microorganismos en el sistema y del patrón de flujo de la fase líquida (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de los biofiltros en función de la fase líquida y biológica (INE, 2005).

| | | Fase líquida | |
|----------------|--------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| | | En movimiento | Estacionaria |
| Fase biológica | Dispersa | Biolavador | |
| | Inmovilizada | Biofiltro de lecho escurrido | Biofiltro de lecho fijo |

A continuación se presenta una breve descripción de estos sistemas:

- Los biofiltros de lecho fijo (BLF) constan de un lecho empacado que se conoce como material filtrante y que puede ser sintético u orgánico, que sirve como soporte para los microorganismos y en el caso de los orgánicos como fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano (Figura 9). Ejemplos de materiales filtrantes utilizados en este tipo de filtros son rocas porosas, tierra de diatomeas, perlita, tierra, trozos de maderas, diferentes tipos de compostas, residuos orgánicos tales como cáscaras de cacahuate, de arroz o de coco, fibra de caña de azúcar, entre otros. El principio de los biofiltros de lecho fijo consiste en hacer pasar la corriente gaseosa saturada de humedad que contiene al contaminante a través del lecho en donde los contaminantes son degradados por los microorganismos. Una característica importante de los BLF es la ausencia de la fase acuosa móvil que los hace convenientes para tratar contaminantes muy poco solubles en agua (INE, 2005; Kennes, 2009).

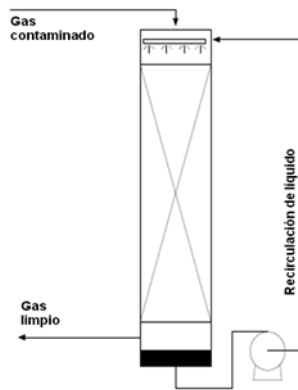


Figura 9. Biofiltro de lecho fijo (modificado de Vedova, 2008).

- El biofiltro de lecho escurrido (BLE) consiste en una columna empacada con un soporte inerte (usualmente de material cerámico o plástico) donde se desarrolla la biopelícula. A través del lecho se alimenta una corriente gaseosa que contiene al sustrato por biodegradar y una corriente líquida que es comúnmente reciclada a través del lecho y que tiene la función de aportar nutrientes esenciales a la biopelícula, así como de remover los productos de degradación de los microorganismos. Estos sistemas se recomiendan para compuestos solubles en agua. Los BLE tienen ventajas similares a los biolavadores, ya que la recirculación del líquido facilita la eliminación de los productos de reacción así como un mayor control sobre el proceso biológico a través del control del pH y la composición del medio líquido. La operación de absorción y biodegradación del contaminante en los BLE se lleva a cabo en un solo reactor, lo cual los pone en ventaja sobre los biolavadores respecto a la operación del mismo. Se ha reportado que en ambos sistemas el principal problema de operación es la solubilización del gas en la fase acuosa, aunque es menos crítico en los BLE (INE, 2005; Kennes, 2009).
- Biolavadores (BL). A diferencia de los biofiltros, el compuesto a degradar primero es absorbido en la fase líquida localizada en una torre de absorción llena de líquido. La operación consiste en hacer fluir el gas a contracorriente a través del líquido, donde los contaminantes y el O_2 son absorbidos. Posteriormente el líquido es alimentado a un reactor empacado de un material inerte cubierto de la película biológica encargada de degradar al contaminante. Los BL son los sistemas más adecuados para el tratamiento de compuestos muy solubles en agua (INE, 2005; Kennes 2009).

En general, la utilización de biofiltros resulta ideal cuando se cuenta con bajas concentraciones de contaminantes y grandes volúmenes de gas. A continuación (Tabla 6) se enlistan algunas otras ventajas, así como desventajas (EPA, 2004; INE, 2005).

Tabla 6. Ventajas y desventajas del uso de biofiltros y biolavadores (INE, 2005).

| Sistema | Ventajas | Desventajas |
|-------------------------------------|--|---|
| Biofiltro de lecho fijo | <ul style="list-style-type: none"> Altas superficies de contacto gas-líquido Fácil arranque y operación Bajos costos de inversión Soporta periodos sin alimentación Conveniente para operación intermitente | <ul style="list-style-type: none"> Poco control sobre fenómenos de reacción Baja adaptación a altas fluctuaciones de flujo de gas Grandes volúmenes de reactor No conveniente para tratamiento de contaminantes cuyos subproductos son compuestos ácidos. |
| Biofiltro de lecho escurrido | <ul style="list-style-type: none"> Control de concentración de sustratos Posibilidad de evitar acumulación de subproductos Equipos compactos Baja caída de presión Alta transferencia de oxígeno y del contaminante | <ul style="list-style-type: none"> Baja superficie de contacto gas-líquido Generación de lodos No resiste periodos sin alimentación Necesidad de suministrar nutrientes Arranque complejo Altos costos de inversión, operación y mantenimiento Taponamiento por biomasa Producción de agua de desecho |
| Biolavador | <ul style="list-style-type: none"> Mejor control de la reacción. Posibilidad de evitar acumulación de subproductos. Equipos compactos Baja caída e presión | <ul style="list-style-type: none"> Baja superficie de contacto gas-líquido No soporta periodos sin alimentación Genera lodo residual Arranque completo Necesidad de aireación extra Altos costos de inversión, operación y mantenimiento |

Estos sistemas han sido poco empleados en el tratamiento de corrientes contaminadas con compuestos orgánicos clorados; sin embargo, existen reportes en donde en biofiltros de lecho fijo, poblados por microorganismos como *Burkholderia cepacia* G4, ha conseguido eliminar hasta 28 mgTCE/ día (Lee, 2003).

Den y Ravindran (2005) estudiaron la biodegradación de diclorometano (DCM) empleando metanol como sustrato y DCM como única fuente de carbono en un sistema de biofiltración, encontrando que la eliminación (>80%) de este organoclorado fue igualmente eficiente en ambos casos, demostrando que el cometabolismo y la oxidación directa de DCM es factible. Ya que la biodegradación de cloroetenos como CV no está ampliamente reportada en sistema de biofiltración, dicho estudio tiene especial relevancia porque se sabe que especies como *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Mycobacterium* son capaces de degradar no solo DCM, sino también CV (Malhautier, Bayle, *etal.*, 2005).

Por otra parte, Aizpuru y colaboradores reportaron en 2005 la utilización de un biofiltro empacado con carbón activado para tratar corrientes contaminadas con una mezcla de COV's (alcoholes, ésteres, aromáticos y organoclorados) obteniendo porcentajes de eliminación del 25% para los compuestos clorados.

En 2009 Bailón realizó ensayos de biodegradación de DCM empleando un sistema de tanque agitado acoplado a un biolavador, con una carga de $40 \text{ gm}^{-3}\text{h}^{-1}$, logrando obtener un porcentaje de remoción del 98%. Aunque observó variaciones mínimas en la población microbiana empleada, predominó la presencia de cepas de *Hyphomircobium*.

1.4 Justificación

Los compuestos orgánicos clorados como el TCE y DCM, entre otros, son disolventes empleados tanto de manera industrial como doméstica, llegan hasta las fuentes de agua al ser vertidos directamente o por filtración, causan severos daños a la salud, siendo el cáncer el más grave de ellos (Hiriart, 2005). Diversos países han establecido un nivel máximo de estos en aguas de uso doméstico, 5µg/L tanto para TCE, como para DCM (EPA, 2000); sin embargo, en México se sabe que algunas fuentes de agua doméstica exceden dicho umbral, ya que no se cuenta con una regulación estricta sobre estos.

Por estas razones proponemos el estudio del efecto de TCE y DCM sobre el crecimiento de una comunidad microbiana aerobia, previamente expuesta a clorofenoles, con fines de ser empleada como posible inóculo en sistemas de tratamiento biológico de aguas contaminadas con este tipo de compuestos.

2. Objetivos

2.1 Generales

- Evaluar el efecto de Tricloroetileno (TCE) y Diclorometano (DCM) sobre el crecimiento de un cultivo aerobio previamente expuesto a clorofenoles.

2.2 Particulares

- Determinar la concentración máxima de TCE y DCM, respectivamente, en la que el cultivo aerobio es capaz de mantener su viabilidad.
- Realizar ensayos cinéticos del cultivo aerobio con TCE y DCM.
- Aclimatar e inmovilizar al cultivo aerobio bajo la presencia de DCM para determinar su potencial uso como sistema de biofiltración de compuestos organoclorados.

3. Metodología

Se obtuvo una población microbiana aerobia de un biofiltro previamente operado con clorofenoles (Ramírez, 2007) presuntamente compuesta de bacterias como *Thibacillus*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* (Ramírez, 2007), al que nos referiremos como “Cultivo A”. El objetivo de la investigación contempló la exposición del “Cultivo A” a dos diferentes disolventes orgánicos clorados, Tricloroetileno (TCE) y Diclorometano (DCM). Se seleccionaron dichos disolventes porque de acuerdo a los estudios mencionados previamente, aquellos organoclorados con menor número de cloros en su estructura son biodegradados fácilmente en sistemas aerobios, como DCM, mientras que los que contienen un número mayor de cloros difícilmente se degradan en este tipo de ambiente, como TCE (DiStefano, 1991). Por otra parte, es sabido que especies como las que presuntamente se encontraban en el inóculo son capaces de emplear organoclorados como DCE, CV y DCM como única fuente de carbono (Hartsmann, 1992; Tejasen, 2004; Bailón, 2009). Tomando esto como punto de partida, se decidió observar el efecto de ambos disolventes sobre el crecimiento del “Cultivo A” cuando son empleados como única fuente de carbono.

Para tal efecto, se realizaron como primer paso microcosmos en donde el Cultivo A fue alimentado regularmente con cada disolvente por separado y se observó hasta qué punto este era capaz de mantener su viabilidad (sección 3.1). Posteriormente se realizaron ensayos cinéticos con una concentración inicial fija de cada disolvente (sección 3.2). Como siguiente paso, se inoculó una columna de cristal empacada con tezontle con el fin de inmovilizar a los microorganismos presentes en el Cultivo A y observar su comportamiento al hacer circular una corriente acuosa que contenía DCM, para observar su potencial uso como sistema de biofiltración (3.3). Finalmente se tomaron muestras del tezontle colonizado y nuevamente se realizaron ensayos cinéticos en microcosmos con TCE (3.4) en una concentración mayor a la del inciso 3.3, con el fin de comprobar si existía adaptación a la presencia de organoclorados.

Cabe destacar que este estudio, aunque tuvo como propósito brindar información sobre el potencial uso del Cultivo A como posible inóculo para llevar a cabo ensayos de biodegradación de organoclorados, no contempló en ningún momento experimentos de la misma, por lo que no se presentan resultados de cromatografía para corroborar la presencia de metabolitos derivados de la degradación de DCM, de TCE o su mineralización. Sin embargo, se realizó una simulación computacional del proceso de biodegradación de TCE, tomando como modelo a *Pseudomonas cepacia* G4. Con el fin de relacionar la simulación con los experimentos realizados, se propusieron dos condiciones de cultivo: oxidación directa, como hipotéticamente ocurriría en los experimentos de la sección 3.2, y cometabolismo, empleando como sustrato tolueno (sección 3.5) a fin de

comparar ambos mecanismos. A continuación se presenta a detalle la metodología seguida en cada serie de experimentos.

3.1 Aclimatación del “Cultivo A” a la presencia de TCE y DCM

Al obtenerse el “Cultivo A” se suspendió en medio de cultivo MSM (Hartmans,1992) conteniendo en g/L: En (g/L): 3.88 K_2HPO_4 , 2.13 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 2 $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 EDTA, 2 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. En (mg/L): 1 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.2 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.4 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, pH final 7.0.

Posteriormente en botellas serológicas se adicionaron 50 mL de medio MSM (pH final 7), 5 mL del “Cultivo A” y se incubaron 30°C y 150 rpm. Se incluyeron dos tratamientos, uno con TCE 2 μM (Sigma-Aldrich), otro con DCM 10 μM (Sigma Aldrich); en ambos casos el organoclorado fue la única fuente de carbono. También se incluyó un control sin disolvente (todos por triplicado) a fin de comprobar que estos fungían como fuente de carbono. Durante 22 días de incubación se añadió la misma concentración de disolventes al medio (cada 6 días) y se obtuvo la concentración de biomasa por cuenta en placa y se determinó en qué tiempo se obtuvo la mayor concentración de esta.

3.2 Cinética de crecimiento del “Cultivo A” con DCM y TCE como única fuente de carbono

En botellas serológicas de 125 mL se colocaron 100 mL de medio MSM (pH final 7), 10 mL del “Cultivo A” y DCM 10 μM y TCE 2 μM (concentraciones en las que se presentó la mayor concentración de biomasa en el experimento anterior), respectivamente, se incluyó un control sin disolvente. Las botellas fueron selladas con válvulas Mininert e incubadas a 30°C y agitación de 150 rpm durante 110 horas (experimentos realizados por duplicado). Cada 12 horas se determinó la concentración de biomasa en los cultivos por la técnica de cuenta en placa.

3.3 Operación de un biofiltro aerobio enriquecido con el “Cultivo A”

En una columna de vidrio (Figura 10) se añadieron aproximadamente 250 mL de soporte (tezontle, $D_{particula} \approx 1.0cm$) y se recircularon 500 mL de medio MSM (pH=7) inoculado con el “Cultivo A” y 40 μM diclorometano (DCM) como única fuente de carbono; el sistema se mantuvo dentro de una cámara de control de temperatura a 30°C. Las condiciones de operación fueron las siguientes:

Volumen total (de la columna) $V_T = 0.35L$

Volumen de operación $V_o = 0.25L$

Diámetro de partícula $D_p \approx 0.5cm$

Flujo de alimentación $Q_A = 0.024 \frac{L}{min}$

Tiempo retención hidráulico

$$HRT = \frac{0.25L}{0.024 \frac{L}{min}} = 10.4 \text{ min}$$

Velocidad de carga

$$L = \frac{40 \frac{\mu mol_{DCM}}{L} (0.024 \frac{L}{min})}{0.25L} = 3.8 \frac{\mu mol_{DCM}}{L \cdot min} = 0.33 \frac{mg_{DCM}}{L \cdot min}$$

La formación de la biopelícula se monitoreó por medio de la determinación de la biomasa por gramos de soporte. Para ello se tomaron muestras del tezontle colonizado y se colocaron en solución salina al 1%, éstas fueron agitadas en *vortex* por un minuto, se realizaron diluciones en solución salina a la misma concentración y luego la biomasa se determinó por la técnica de cuenta viable (extensión con varilla). Las muestras de soporte fueron colocadas en una estufa a 70°C hasta haber perdido por completo la humedad.

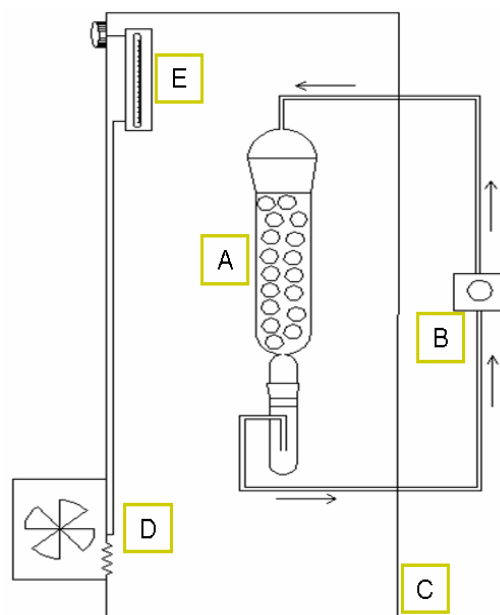


Figura 10. Biofiltro. A) Columna de vidrio, B) bomba peristáltica, C) cámara de control de temperatura, D) ventilador y resistencia eléctrica, E) termómetro.

Al cabo de 120 días de operación, la concentración de biomasa en el soporte era muy baja, $1.4 \times 10^4 \text{ UFC/g}_{\text{soporte}}$, por lo que se decidió adicionar al medio de cultivo glucosa a fin de incrementar la masa de biopelícula. Durante 190 días más de operación se redujo gradualmente la concentración de glucosa y se aumentó la de DCM como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Cambio de las concentraciones de glucosa y DCM en el biofiltro.

| Tiempo de incubación (días) | Glucosa (g/L) | Velocidad de carga de Glucosa ($\text{mgL}^{-1}\text{min}^{-1}$) | Diclorometano (μM) | Velocidad de carga de DCM ($\text{mgL}^{-1}\text{min}^{-1}$) |
|-----------------------------|---------------|--|---------------------------------|--|
| 120 | - | - | 40 | 0.33 |
| 127-134 | 10 | 960 | 60 | 0.43 |
| 147-150 | 5 | 480 | 60 | |
| 166 | 3.75 | 360 | 60 | |
| 173 | 3.75 | 360 | 200 | 1.63 |
| 180 | 2 | 192 | 200 | |
| 201 | 1 | 96 | 200 | |
| 269 | 0.1 | 9.6 | 200 | |

A los 310 días de incubación se tomaron muestras del soporte colonizado y se obtuvieron fotografías en un microscopio electrónico de barrido. También se obtuvieron micrografías del soporte (tezontle) sin colonizar.

3.4 Cinéticas de crecimiento con muestras del biofiltro

Con el fin de observar si existía adaptación de la biopelícula formada a altas concentraciones de organoclorados, DCM, se tomaron muestras del soporte, se desprendió la biomasa (por agitación) y se realizaron nuevamente ensayos cinéticos con TCE, esta vez la concentración fue 5 veces mayor a la de los experimentos del inciso 3.2. La metodología se describe a continuación:

Se obtuvieron muestras del biofiltro (2 a 3 piedras) previamente aclimatado a la presencia de DCM y se suspendieron en solución salina al 1%, posteriormente se mantuvieron en un *vortex* durante 3 minutos para liberar la biomasa. La biomasa libre se colocó en botellas serológicas de 125 mL con 50 mL de medio MSM (pH 7) y 10 μ M TCE (como única fuente de carbono). Las botellas se sellaron con válvulas Mininert y fueron incubadas a 30°C y agitación constante (150 rpm aproximadamente) durante 144 horas. Se determinó la concentración de biomasa por medio de la técnica de cuenta viable (extensión por varilla). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, se incluyó un control sin TCE.

3.5 Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE

Finalmente, se realizó una simulación computacional del proceso aerobio de biodegradación de TCE con células libres, con el fin de tener una idea de cómo podría ocurrir este proceso en los experimentos del inciso anterior (3.4).

Para tal efecto, se tomó el modelo propuesto por Álvarez Cohen, 2001 en el que se describe la biodegradación de compuestos organoclorados de manera cometabólica; la ecuación de dicho modelo se presenta a continuación:

$$-\frac{dS_c}{dt} = \frac{q_c S_c X K_c}{K_g \left(1 + \frac{S_g}{K_{isg}}\right) + S_c} \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde S_c : concentración de organoclorado (mg/L), q_c : tasa de eliminación máxima (mg/Ld), K_c : coeficiente específico de degradación del organoclorado (mg/mgd), X : concentración de biomasa inicial (mg/L), K_g : coeficiente específico de consumo de sustrato de crecimiento (mg/mgd), S_g :

concentración de sustrato de crecimiento (mg/L), K_{isg} : constante de inhibición (mg/mgd). La ecuación diferencial de primer orden se resolvió y graficó en MATLAB®. Para la solución, se plantearon dos condiciones de cultivo:

- (1) TCE en 10 μ M y 10 mM de tolueno, a fin de simular la biodegradación cometabólica. Se eligió tolueno por ser una fuente de carbono de sencilla asimilación (Folsom,1991).
- (2) 10 μ M TCE (única fuente de carbono), simulando el proceso de oxidación directa.

Para ambas condiciones se fijó una concentración de biomasa de 10 mg/L. Los parámetros de la Ecuación 1 se tomaron de (Álvarez Cohen, 2001), seleccionando como microorganismo de referencia a *Pseudomonas cepacia* G4, ya que existen reportes sobre el metabolismo oxidación de TCE en este microorganismo cuando se cultiva en concentraciones que oscilan entre 0.6 – 6.6 mg/L (Folsom, 1991), rango en el que se llevaron a cabo los experimentos de los incisos 3.2 y 3.4; los valores de los parámetros de la Ecuación 1 se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de los parámetros de la Ecuación 1.

| Parámetro | Valor | Parámetro | Valor |
|---|--|--|---|
| Tasa de eliminación máxima | $q_c=0.45\text{mgL}^{-1}\text{d}^{-1}$ | Concentración de sustrato de crecimiento | $S_c=2.62\text{mgL}^{-1}=10\mu\text{M}$ |
| Coefficiente específico de biodegradación | $K_c=1.5\text{mgmg}^{-1}\text{d}^{-1}$ | Constante de inhibición | $K_{isg}=0.11\text{mgmg}^{-1}\text{d}^{-1}$ |
| Coefficiente específico de consumo de sustrato de crecimiento | $K_g=3\text{mgmg}^{-1}\text{d}^{-1}$ | Concentración de biomasa | $X=10\text{mgL}^{-1}$ |

4. Resultados

4.1 Aclimatación del “Cultivo A” a la presencia de TCE y DCM

Durante 22 días de incubación se incrementó la concentración de DCM y TCE hasta llegar a 30 μM y 6 μM , respectivamente (Tabla 9). Es evidente, de acuerdo a la Figura 11, que la máxima concentración de DCM y TCE que es capaz de resistir el “Cultivo A” es 20 μM y 4 μM , respectivamente.

Tabla 9. Incremento de la concentración de los disolventes en el medio durante el tiempo de incubación.

| | 0 día | 8 días | 15 días | 22 días |
|-------------------------|-------|--------|---------|---------|
| ◆ TCE (μM) | 2 | 4 | 6 | 10 |
| ■ DCM (μM) | 10 | 20 | 30 | 40 |

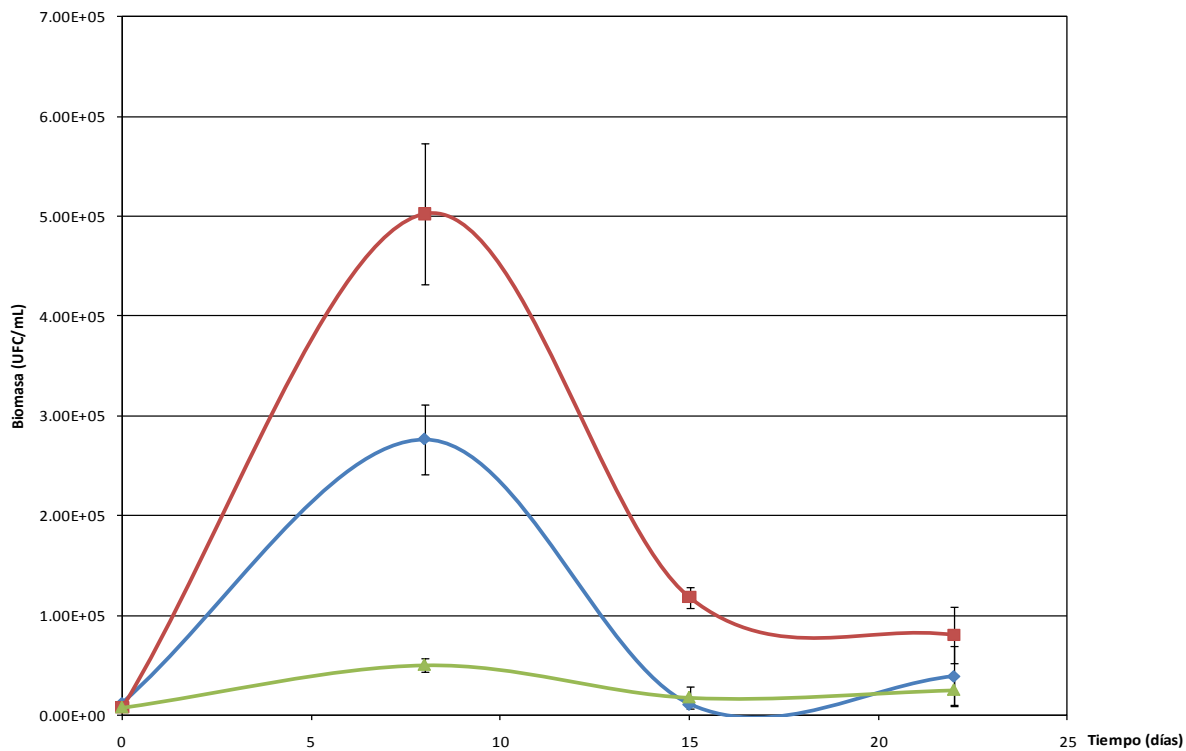


Figura 11. Efecto de organoclorados sobre el “Cultivo A”. ■ DCM, ◆ TCE, ▲ Control sin organoclorado (verde).

Al término de los 22 de incubación, las botellas fueron abiertas y se determinó el pH final del medio siendo este 7, mismo valor que al inicio del experimento.

Pese a que no se monitoreó la concentración de ambos disolventes ni la aparición de productos de biodegradación, podría suponerse que los resultados obtenidos tienen origen en la hipótesis antes planteada, que bajo condiciones aerobias aquellos disolventes con mayor número de cloros en su estructura, como TCE, presentan un impacto negativo mayor sobre distintos microorganismos, mientras que a menor número de cloros, DCM, el efecto disminuye; hecho que se corrobora al observar la concentración de biomasa en la Figura 19, ya que al cabo de 8 días de incubación los tratamientos con TCE 2 μM presentaron $2.76 \times 10^5 \pm 3.54 \times 10^4$ UFC/mL, mientras que en los que contenían DCM 10 μM se obtuvieron $5.03 \times 10^5 \pm 7.11 \times 10^4$ UFC/mL, aproximadamente dos veces más que aquellos con TCE.

4.2 Cinéticas de crecimiento del “Cultivo A” con DCM y TCE como única fuente de carbono

En las Figuras 12 y 13 se muestran las cinéticas de crecimiento realizadas empleando DCM 10 μM y TCE 2 μM , respectivamente.

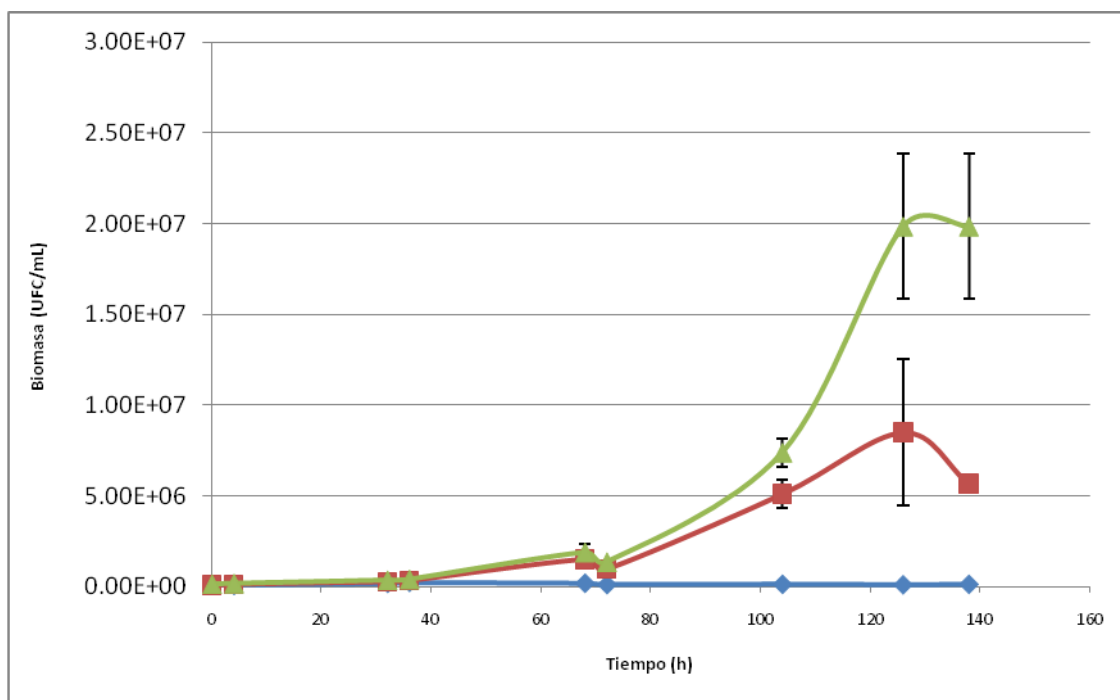


Figura 12. Cinética de crecimiento con DCM y TCE como únicas fuentes de carbono. ■ 2 μM TCE, ▲ 10 μM DCM, ♦ Control.

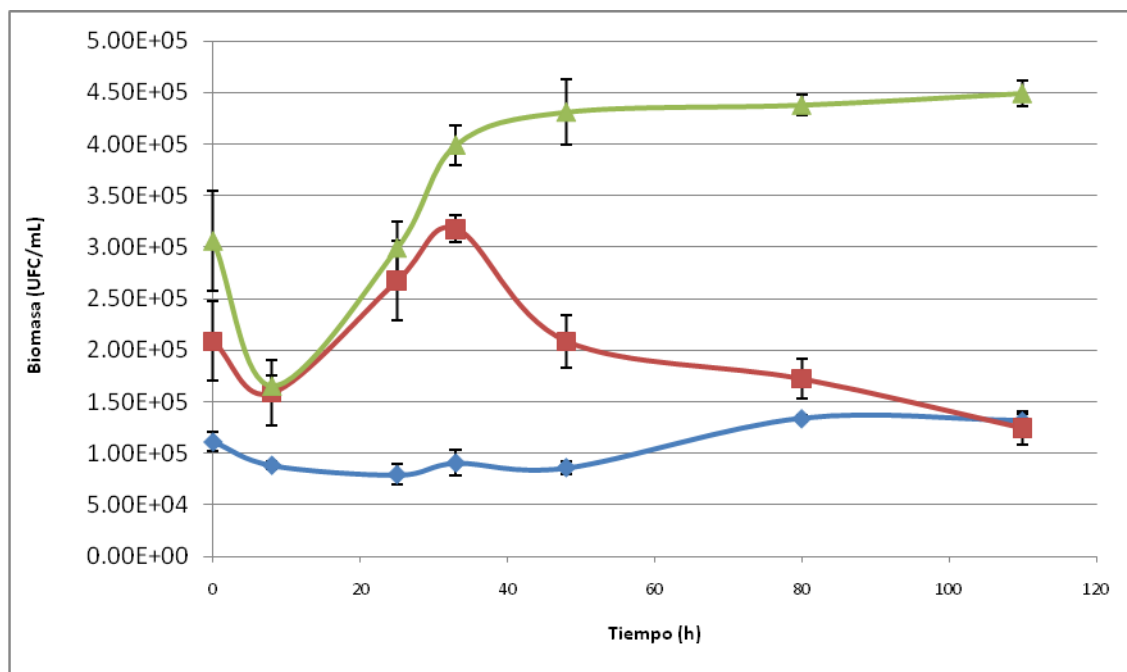
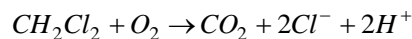


Figura 13. Segunda cinética de crecimiento con DCM y TCE como únicas fuentes de carbono. ■ 2µM TCE, ▲ 10µM DCM, ◆ Control.

En ambas gráficas se observa que en presencia de DCM el “Cultivo A” es capaz de conservar su viabilidad al cabo de 110 horas de incubación; sin embargo, cuando esta se encuentra en presencia de TCE, se presenta una clara inhibición. Incubación posterior (30 días) mostró que la comunidad bacteriana conservaba su viabilidad.

En ambos casos, tanto el TCE como el DCM resultaron ser una fuente de carbono útil para producir biomasa. Sin embargo, no es posible afirmar el mecanismo de degradación que llevan a cabo los microorganismo presentes en el “Cultivo A”.

Wang y colaboradores, en el año 2005, reportaron rendimientos de biomasa con DCM como única fuente de carbono de $0.12 \text{g}_{\text{célulassecas}}/\text{g}_{\text{DCM}}$. Tomando este dato referencia, se realizó un cálculo hipotético de la cantidad generada de biomasa y de la concentración de CO_2 esperada considerando que la mineralización es completa,



$$Y_{X/DCM} = 0.12 \frac{g_{célula\ sec\ a}}{g_{DCM}}$$

Sabiendo que se suministraron 0.04mg de DCM (10 μ M) se obtienen 0.005 mg de células y, asumiendo que el resto se mineraliza por completo, se obtendrían 0.035 mgCO₂. Futuras investigaciones que incluyan análisis cromatográficos permitirán corroborar dicha hipótesis, así como esclarecer el mecanismo de degradación empleado por los microorganismos del “Cultivo A”.

4.3 Operación de un biofiltro aerobio enriquecido con el “Cultivo A”

Al cabo de 120 días de incubación (medio MSM y 40 μ M DCM) bajo estas condiciones, la biomasa en el biofiltro fue 1.4x10⁴UFC/g_{soporte}; para incrementarla se añadieron 10g_{glucosa}/L al medio de cultivo. Posteriormente, la concentración de glucosa se redujo y se incrementó la de DCM a lo largo de 159 días más de incubación.

A los 269 días de operación se obtuvo una concentración de biomasa de 1.74x10¹³±4.72x10¹¹ UFC/g_{soporte} contando en el medio con 0.1 g_{glucosa}/L y 200 μ M DCM. Finalmente, transcurridos 300 días de operación, el sistema contaba con una concentración total de biomasa de 2.79x10¹⁰±5.22x10⁹ UFC/g_{soporte}, implicando una reducción en la cantidad de biomasa de tres órdenes de magnitud, probablemente ocasionada por la presencia de una elevada concentración de DCM en el medio, 200 μ M. A los 310 días de incubación bajo las mismas concentraciones de glucosa (0.1 g/L) y DCM (200 μ M) la biomasa presente en el soporte se mantuvo constante, mostrando adaptación a estas condiciones de cultivo.

Paralelamente se realizó una estimación de la biomasa producida en biofiltro considerando que se recirculó 0.5L de medio cultivo con una concentración de glucosa de 10 g/L.

Si se considera que se tiene un rendimiento típico (Ordaz y Álvarez, 1998) biomasa-sustrato de $Y_{X/S}=0.5 \text{ g}_{biomasa}/\text{g}_{sustrato}$ en glucosa, entonces la biomasa esperada será de:

$$Y_{X/S} = \frac{g_{biomasa}}{g_{sustrato}}$$

$$g_{biomasa} = Y_{X/S} \cdot g_{sustrato} = 0.5 \frac{g_{biomasa}}{g_{sustrato}} \cdot 5 g_{sustrato} = 2.5 g_{biomasa}$$

Dicha estimación, aunque empírica, permite tener una idea clara de cuánta biomasa se produce en el sistema considerando solo a la glucosa como fuente de carbono.

En la Figura 14 se muestran imágenes del proceso de colonización del soporte en el biofiltro a diferentes tiempos de operación. En la Figura 14A (120 días, $1.4 \times 10^4 \pm 8.0 \times 10^2$ UFC/g_{soporte}) el medio de cultivo solo contenía 40 μ M DCM como única fuente de carbono. A los 269 días de operación la concentración de glucosa se redujo a 0.1 g/L y la de DCM se incrementó hasta 200 μ M, obteniendo así una concentración de biomasa de $1.05 \times 10^{12} \pm 3.54 \times 10^{11}$ UFC/g_{soporte}.

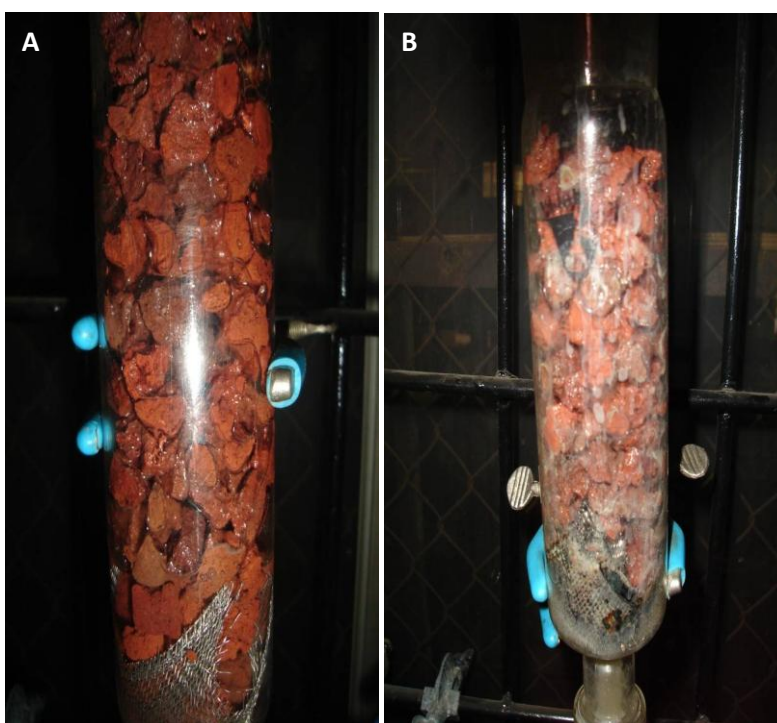


Figura 14. Colonización del soporte al inicio y término de la operación. A 120 días 40 μ M DCM como única fuente de carbono, B 269 días, 200 μ M DCM y 0.1 g_{glucosa}/L

Por otra parte, en la Figura 15 se presentan fotografías tomadas a diferentes ampliaciones por microscopía electrónica a los 310 días de incubación, teniendo una concentración de biomasa de $2.09 \times 10^{10} \pm 5.22 \times 10^9$ UFC/g_{soporte}; para este tiempo la concentración de DCM se mantuvo en 200 μ M, mientras que la de glucosa se redujo hasta 0.05 g/L.

En la Figura 15A se observa el soporte (tezontle) sin biomasa. El resto de las fotografías confirman la presencia de distintos tipos de bacterias como cocos y bacilos (B, C, D, E), mientras que en la Figura 15F se observan dos microorganismos de mayor tamaño, podría asumirse que son levaduras. Es importante hacer mención a la densa capa de biopolímeros en la que se encuentran inmersos los microorganismos.

Al inicio de la operación del biofiltro se realizaron tinciones de Gram, esta permitió observar la presencia de bacilos Gram negativos únicamente; por otra parte, al cabo de los 310 días de operación, esta tinción mostró la presencia tanto de bacilos negativos, como de cocos y otros bacilos Gram positivos, lo que muestra que la composición de los microorganismos presentes en la biopelícula varió notablemente, hecho que tiene origen en las configuración del biofiltro, ya que este se puede considerar como un sistema abierto, lo que permite la intrusión de otras especies microbianas. A los 310 días de operación, la concentración de glucosa, como se mencionó anteriormente, fue de 0.1 g/L (55.55 μ M), 3.6 veces menor que la de DCM al mismo momento (200 μ M), por lo que puede afirmarse que los microorganismos ajenos a los presentes en el "Cultivo A" también son capaces de crecer, probablemente de utilizar al DCM como fuente de carbono u oxidarlos fortuitamente por cometabolismo.

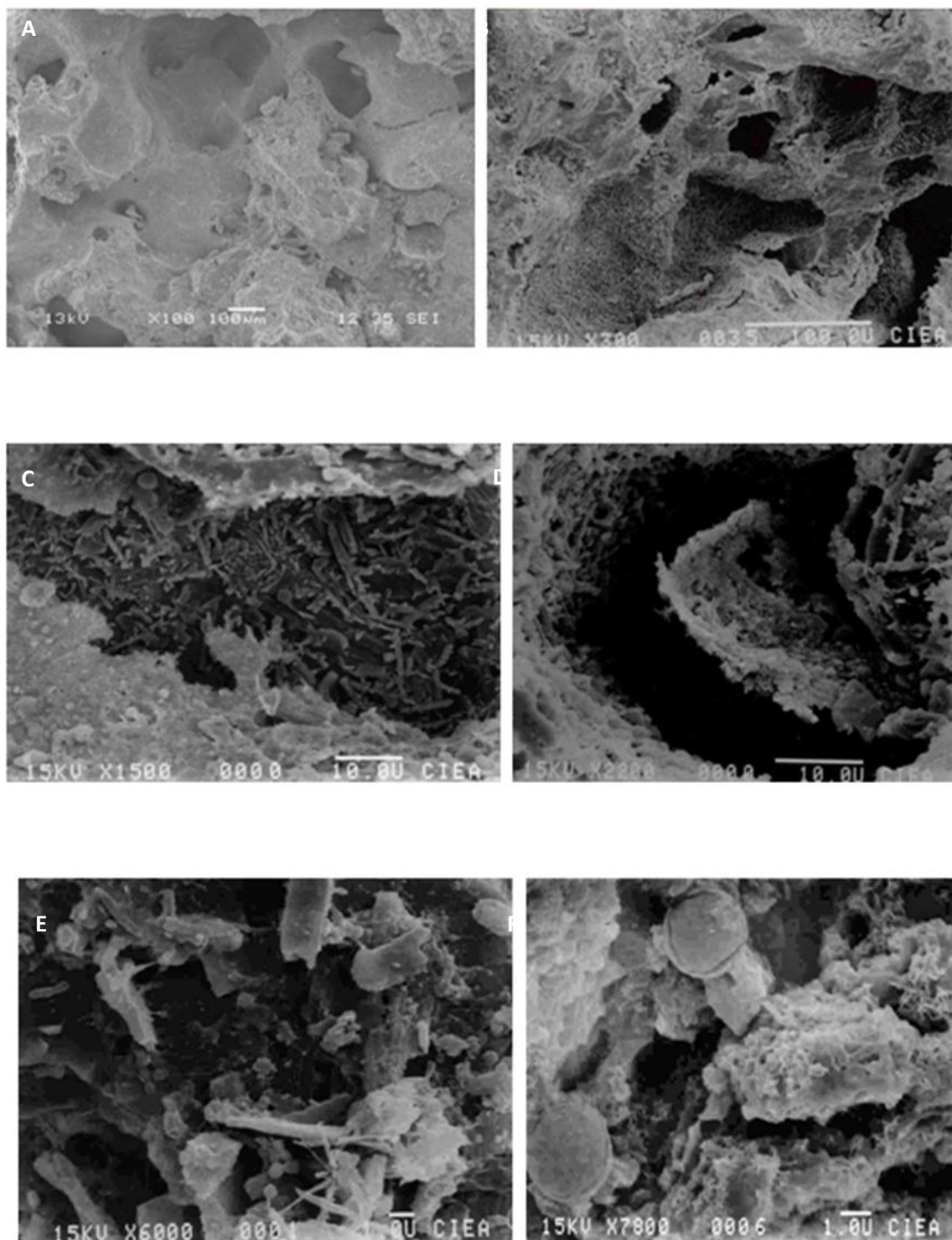
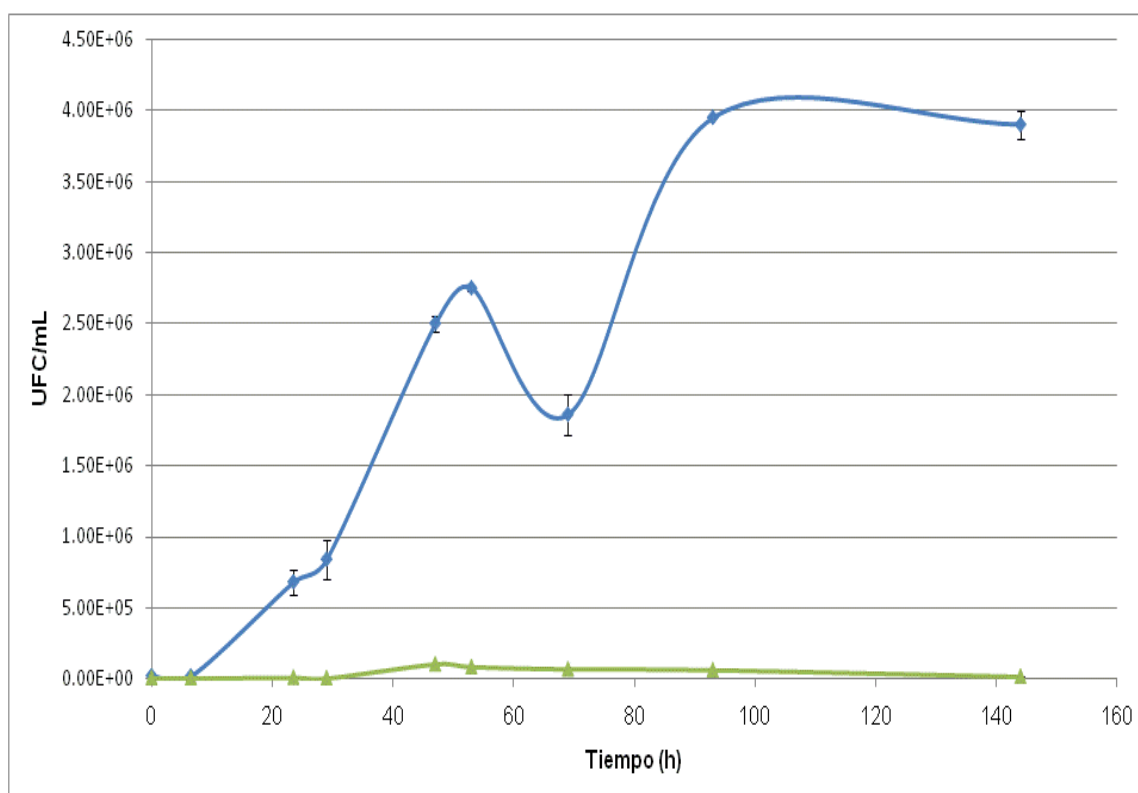


Figura 15. Micrografías del soporte colonizado (biopelícula) a los 310 días de incubación tomadas al microscopio de barrido de electrones. A control sin biomasa, B/C/D/E/F muestras con biomasa a distintas amplificaciones.

4.4 Cinética de crecimiento con muestras del biofiltro aclimatado a la presencia de DCM

Se llevó a cabo una tercera cinética de crecimiento empleando como inóculo el soporte colonizado del biofiltro aerobio. Ya que la biomasa presente en este se encontraba mejor adaptada a la presencia de un disolvente poco clorado en altas concentraciones (200 μM), se decidió utilizar TCE 10 μM como única fuente de carbono y monitorear su concentración a lo largo de 144 horas de incubación (Figura 16). La concentración inicial de biomasa para los tratamientos con TCE fue de $1.6 \times 10^4 \pm 1.00 \times 10^2$ UFC/mL, mientras que para los controles de $8.4 \times 10^3 \pm 6.55 \times 10^2$ UFC/mL.



**Figura 16. Cinética de crecimiento empleando soporte del biofiltro como inóculo. ♦ 10 μM TCE
▲ Control sin TCE.**

Se observó que el comportamiento de la biomasa era igual que al reportado en las cinéticas previas (inciso 4.2), la concentración final fue de $3.9 \times 10^6 \pm 1.00 \times 10^5$ UFC/mL. Cabe destacar que estos experimentos se llevaron a cabo empleando cinco veces la concentración de TCE previamente utilizada, hecho que implica una mejor adaptación de los microorganismos presentes

en el biofiltro a la presencia de organoclorados, pese a que el disolvente empleado consta de un mayor número de cloros en su estructura.

4.5 Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE

La simulación computacional del proceso de biodegradación aerobia de TCE se evaluó en un periodo de 7 días, tiempo equivalente a los ensayos realizados en el inciso 4.4. La Tabla 10 y la Figura 17 muestran los resultados obtenidos. Es importante mencionar que se considera un sistema con células libres. El modelo de biodegradación seleccionado para llevar a cabo la simulación es una ecuación diferencial de primer orden, fue resuelta por el método de variables separables y graficada con los valores mencionados en la sección 3.5 con MATLAB®.

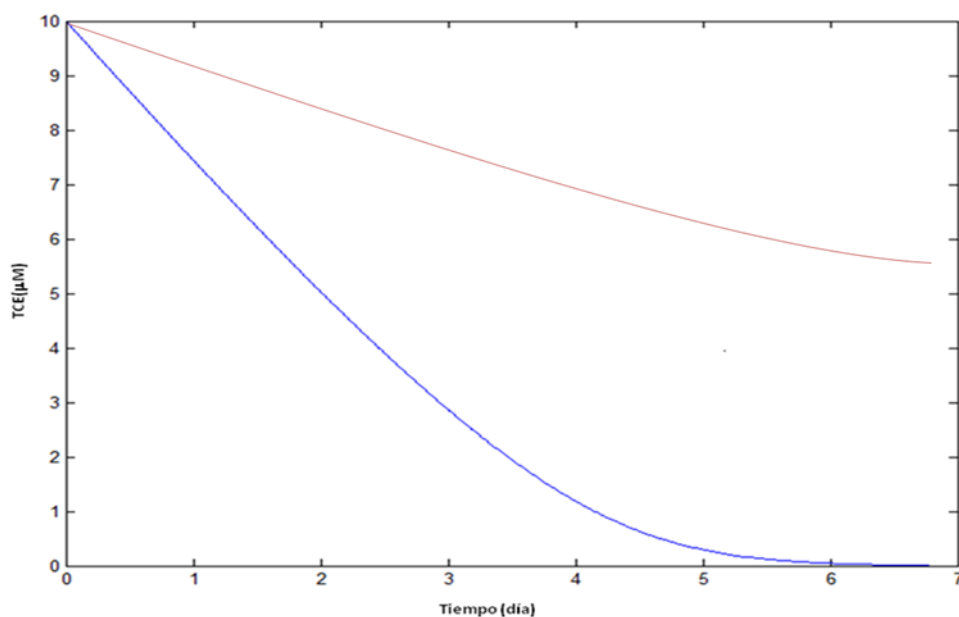


Figura 17. Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE. – TCE 10µM+Tolueno 10 mM, -- TCE 10 mM.

Tabla 10. Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE.

| Tiempo (día) | TCE (μM) cometabolismo | TCE (μM) Oxidación directa |
|---------------------|---|---|
| 0 | 10 | 10 |
| 0.5 | 8.45 | 9.95 |
| 1 | 7.50 | 9.75 |
| 1.5 | 6.35 | 9.23 |
| 2 | 4.82 | 8.85 |
| 2.5 | 4.97 | 8.3 |
| 3 | 3.79 | 8.0 |
| 3.5 | 1.89 | 7.3 |
| 4 | 1.23 | 7.0 |
| 4.5 | 0.68 | 6.55 |
| 5 | 0.16 | 6.35 |
| 6 | 0.08 | 5.75 |
| 7 | 0.05 | 5.55 |

Se observa que tras 7 días el porcentaje de eliminación es del 95% cuando el sistema cuenta con la presencia de tolueno 10 mM. Sin embargo, en las condiciones en las que el TCE funge como única fuente de carbono, el porcentaje de eliminación solo alcanza un 55%. Dicho resultado hace evidente que la oxidación de TCE por el mecanismo cometabólico es 2 veces más eficiente que la oxidación directa.

Aunque en las secciones previas no se empleó tolueno para probar el posible mecanismo cometabólico del "Cultivo A", los resultados aquí presentados permiten plantear futuras estrategias en donde este derivado del benceno podría favorecer la biodegradación de TCE empleando a este cultivo como inóculo.

5. Análisis de resultados

5.1 Aclimatación del “Cultivo A” a la presencia de TCE y DCM

Dichos ensayos mostraron que la adición constante de TCE y DCM inhibe el crecimiento del “Cultivo A”. Para ambos experimentos se inició con una concentración de biomasa de 1×10^4 UFC/mL, obteniéndose la máxima a los 2 días de incubación $2.76 \times 10^5 \pm 3.55 \times 10^4$ UFC/mL con $2 \mu\text{M}$ TCE y $5.03 \times 10^5 \pm 7.11 \times 10^4$ UFC/mL con $10 \mu\text{M}$ DCM.

Al cabo de 22 días de incubación y teniendo 6 y $30 \mu\text{M}$ de TCE y DCM, respectivamente; la biomasa fue de 4×10^4 UFC/mL, aproximadamente, para ambos tratamientos, hecho que podría reflejar que bajo la presencia de estas concentraciones de organoclorados, cuando son utilizados como únicas fuentes de carbono y energía, los microorganismos presentan inhibición en el crecimiento

Es importante hacer notar que la adaptación del “Cultivo A” a la presencia de DCM en el medio es más eficiente que cuando es expuesta a TCE. Algunos de los motivos que explican los resultados anteriores se enlistan a continuación:

1. Bajo condiciones aerobias, la degradación de compuestos con menor número de cloros en su estructura (DCM) se lleva a cabo de manera más eficiente que con aquellos con un número superior (TCE) (DiSteffano, 1991). Aunque esta hipótesis no puede ser corroborada ya que no se realizó la detección de intermediarios de la degradación o de CO_2 , en caso de existir mineralización. Además, es sabido que la estructura del TCE es sumamente estable en comparación con otros cloroetenos como DCE o algunos clorometanos; por tal motivo, su asimilación como sustrato de crecimiento es menos eficiente (Tejasen, 2004, EPA, 2000). Por otra parte, el efecto citotóxico de TCE en comparación con DCM, es mayor (Coleman y Spain, 2003); por este motivo, la adaptación a su presencia en el medio y su uso como fuente de carbono se ven disminuidos.
2. La baja producción de biomasa en los tratamientos TCE puede estar influida por la destrucción de las membranas celulares por efecto del disolvente o por la formación del TCE-epóxido, intermediario de la biodegradación de este cloroetano, que es altamente inestable y, por tanto, su toxicidad es mayor que la de TCE (Coleman y Spain, 2003; Yeager, 2001). La destrucción de membranas celulares también se observa en microorganismos expuestos a DCM (Krausova, 2003), hecho que reflejaría porque la biomasa se redujo a medida que la concentración de este compuesto se incrementó al igual que con el TCE.

3. Es sabido que microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* o *Rhodococcus* (Ramírez, 2007), bacterias que posiblemente se encuentren en el inóculo obtenido y que previamente había sido expuesto a clorofenoles, son capaces de llevar a cabo la biodegradación de organoclorados como DCM o TCE (Watts, 1997; Reineke, 2002; Whitaker, 2008). Anteriormente se mencionó que bacterias como *Pseudomonas sp.* son capaces de utilizar diclorometano como única fuente de carbono cuando este se presenta en concentraciones menores a 0.1 mM (Reineke y Agathos, 2002), suponiendo que este microorganismo predomina en el “Cultivo A”, se comprueba tal hecho, ya que después de ser expuesto a concentraciones mayores de 20 μM (0.2 Mm) la biomasa se reduce hasta alcanzar una concentración cercana a la inicial.

5.2 Cinéticas de crecimiento empleando organoclorados como única fuente de carbono y energía

Una vez definida la máxima concentración de TCE y DCM que la comunidad microbiana era capaz de tolerar sin ver afectada la producción de biomasa, 2 y 10 μM respectivamente, se probaron estas para llevar a cabo cinéticas de crecimiento.

En las Figuras 12 y 13 se confirmó que el TCE es un sustrato menos eficiente que el DCM, ya que al cabo de aproximadamente 120 días de incubación, la concentración de biomasa había decaído aproximadamente la hasta la mitad de la máxima obtenida ($3.18 \times 10^5 \pm 1.28 \times 10^4$ UFC/mL).

Por otra parte, los tratamientos que contenían 10 μM DCM al término del mismo tiempo de incubación no presentaron una disminución considerable en la concentración de biomasa, confirmando nuevamente que aquellos disolventes con menor número de cloros en su estructura son biodegradados eficientemente bajo condiciones de aerobiosis (DiSteffano, 1991); sin embargo, la falta de métodos analíticos (cromatografía de gases) no permitió corroborar el incremento en la concentración de CO_2 y la reducción de la concentración de DCM. Se continuó monitoreando la concentración de biomasa en ambos tratamientos durante 30 días más (datos no mostrados) y se observó que la viabilidad de los microorganismos se conservaba, siendo superior la de aquellos expuestos a DCM. Al término de los experimentos se monitoreó el pH, este permaneció igual que al inicio de la incubación (pH=7), por lo que es posible descartarlo como factor determinante en la disminución de la biomasa.

Realizando la misma hipótesis que en el inciso anterior, de que *Pseudomonas* es el microorganismo predominante en el “Cultivo A”, se comprueba nuevamente la capacidad de este

microorganismo para crecer y mantener su viabilidad al ser cultivado con DCM ≤ 0.1 mM (Reineke y Agathos, 2002).

Por otra parte, se comprobó que la utilización de TCE como única fuente de carbono, asumiendo un mecanismo de oxidación directa, es poco eficiente, ya que al cabo 120 de días de incubación la biomasa en los microcosmos se redujo incluso por debajo de la concentración inicial (Figura 13). Este hecho puede tener un segundo fundamento si recordamos la enorme capacidad de este disolvente para destruir membranas celulares (Yeager, 2001).

Considerando los resultados obtenidos de biomasa y CO₂ (cálculo hipotético) con referencia a los trabajos de Wang, (2005), se observa que solo el 12% del carbono proveniente del DCM se utiliza para la formación de biomasa, mientras que el resto, 88%, se mineraliza por completo. Asumiendo que se cuenta con cepas de *Pseudomonas* o *Xantobacter* similares a las utilizadas en dicho estudio, se obtendrían tasas de biodegradación superiores al 80%, mismas que deberán ser corroboradas a través de estudios de cromatografía de gases; aunque es importante remarcar que el monitoreo de la presencia de formaldehído en el medio podría brindar evidencias no solo de la utilización de DCM como única fuente de carbono, sino también del mecanismo de degradación, mismo que reflejaría la presencia de bacterias metilótrofas (Trotsenko, 2009) en el “Cultivo” (hecho comprobable con técnicas de identificación molecular, DGGE, no realizado en este estudio).

5.3 Operación de un biofiltro aerobio enriquecido con el “Cultivo A”

La operación del biofiltros se inició inoculando una columna de cristal con tezontle, este empaque se seleccionó por ser inerte, de bajo costo y presentar alta resistencia durante periodos largos de operación (Ramírez, 2007). Tal como se mencionó en el inciso 3.1, el inóculo empleado fue previamente expuesto a un compuesto orgánico clorado, clorofenol, es por ello que resultaba natural pensar que la comunidad microbiana presente en el “Cultivo A” tendría un sistema enzimático activo capaz de biodegradar otro tipo de organoclorados como TCE o DCM, ya que se sabe que enzimas como la mono o dioxigenasa promueven la degradación de estos contaminantes (EPA, 2000). Además, aunque los microorganismos presentes en dicha comunidad no han sido identificados, se presume la presencia de bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Rhodococcus*, ambas relacionados con la biodegradación de compuestos como CV o DCM (Malachowsky, 1993; Watts, 1997; Reineke, 2002; Whitaker et al., 2008).

El biofiltro inició su operación recirculando medio de cultivo MSM (Hartmanns, 1992) y una concentración de DCM de 40 μ M y el inóculo antes descrito. Se seleccionó DCM como

contaminante para iniciar la aclimatación del “Cultivo A” a un organoclorado por estar descrito como un compuesto de fácil degradación bajo condiciones aerobias, por el bajo número de cloros en su estructura (DiSteffano, 1991), porque existen especies microbianas, antes mencionadas, que son capaces de degradar este compuesto como otros más tóxicos como el CV, y por que existen reportes que involucran el mismo tipo de enzimas en la biodegradación aerobia de TCE y DCM (Hägglom, 2003). Además, el “Cultivo A” había sido expuesto a 10 μM DCM por un periodo de 30 días sin perder su viabilidad, en base a esto se decidió incrementar la concentración a 40 μM ya que de acuerdo a los estudios de Trotsenko de 2009, algunas bacterias, principalmente metilótroas, cuentan con sistemas enzimáticos inducibles (DCM-dehalogenasa), hecho que les permite adaptarse a mayores concentraciones de xenobióticos como DCM.

Es importante precisar que el sistema de biofiltración operó a manera de biolavador, ya que en estos el contaminante en fase gaseosa se disuelve previo a la introducción en el biofiltro (INE, 2005), en nuestro sistema se alimentó una corriente líquida del contaminante, DCM. Es sabido que este COV es sumamente volátil, por eso se pensaría en emplear sistemas de lecho fijo o escurrido; sin embargo, Wang, en 2006, operó un sistema de biolavado para eliminar DCM, comprobando que a temperaturas entre 25-30°C los procesos de transferencia de masa en la biopelícula se veían favorecidos.

Como se observó en la sección de resultados, al cabo de 120 días de operación la biomasa en el sistema fue de $1.4 \times 10^4 \text{ UFC/g}_{\text{soporte}}$, por lo que se decidió suplementar el medio de cultivo con 10 $\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{L}$ para promover la producción de biomasa, manteniendo la presencia de DMC en una concentración de 40 μM . La colonización del soporte fue inmediata tras la adición de glucosa al medio, por ello se decidió reducir su concentración y aumentar la de DCM, a los 269 días de operación se obtuvo una de biomasa de $1.74 \times 10^{13} \pm 4.72 \times 10^{11} \text{ UFC/g}_{\text{soporte}}$ contando en el medio con 0.1 $\text{g}_{\text{glucosa}}/\text{L}$ y 200 μM DCM. Finalmente, trascurridos 300 días de operación, el sistema contaba con una concentración total de biomasa de $2.79 \times 10^{10} \pm 5.22 \times 10^9 \text{ UFC/g}_{\text{soporte}}$. De lo anterior, dos hechos resultan evidentes: 1) el aumento en la concentración de biomasa en el soporte se atribuye a la glucosa; sin embargo, la elevada concentración de DCM, 200 μM , pudo actuar como factor de selección, de esta forma solo los microorganismos capaces de tolerar al disolvente en esta concentración pudieron proliferar, 2) el aumento de la concentración de DCM en el medio provocó la reducción en la biomasa al reducir la de glucosa casi a cero; sin embargo, se puede asumir que la comunidad presente en el soporte es altamente resistente a elevadas concentraciones de este organoclorado. Aunque no se comprobó la eficiencia de eliminación del sistema, estudios como los realizados por Bailón en 2009, demuestran que al operar el sistema de biofiltración con cargas de entre 40 y 100 $\text{g m}^{-3}\text{h}^{-1}$ de DCM (con volúmenes de operación menores

a 2 L) inoculados con cultivos mixtos, es posible obtener eficiencias de remoción mayores del 90%; ya que nuestro sistema fue operado con una carga de $98.7 \text{ gm}^{-3}\text{h}^{-1}$ de DCM, podrían esperarse valores similares, una vez comprobada la biodegradación por medio de técnicas cromatográficas.

Por otra parte, tal como se describió anteriormente, se obtuvieron micrografías en un microscopio electrónico de barrido a los 310 días de operación. Las distintas imágenes muestran la presencia de distintas morfologías bacterianas, como cocos, bacilos e incluso se observan microorganismos de mayor tamaño, mismos que podrían ser levaduras. Paralelamente se realizaron tinciones Gram a muestras del mismo tiempo de operación, al inicio mostrando la presencia única de bacilos Gram negativos; sin embargo, al concluir la operación, las tinciones mostraron la presencia dominante de bacilos Gram negativos, así como de cocos y bacilos positivos, evidenciando que la comunidad microbiana cambió respecto al tiempo. Este hecho tiene origen en la naturaleza del biofiltro, ya que este se operó como un sistema abierto, permitiendo así la introducción de microorganismos distintos a los presentes inicialmente en el "Cultivo A". Aunque el objetivo era evaluar el comportamiento de este cultivo, la detección de microorganismos diferentes podría resultar en beneficios en términos de la capacidad de biodegradación de DCM. Estudios realizados con cultivos mixtos para la eliminación de DCM por biofiltración (Bailón, 2009) también reportan variaciones en la composición de las especies microbianas; sin embargo, se observa el dominio de las especies mejor adaptadas.

Es importante mencionar que la obtención de las fotografías en el microscopio de barrido de electrones no resultó sencilla, ya que los microorganismos se encontraban inmersos en una densa capa amorfa, esta podría ser algún biopolímero excretado por la comunidad microbiana para favorecer su fijación al soporte.

Los microorganismos observados tanto en las micrografías como en las tinciones Gram, así como la presencia de un biopolímero en el soporte, podrían ser indicativos de la presencia de *Pseudomonas* en el sistema, ya que se sabe que esta bacteria Gram negativa ha sido aislada de distintos sitios contaminados con una amplia variedad de contaminantes como petróleo, es capaz de excretar exopolisacáridos al medio, hecho que favorece su adhesión a distintas superficies; además, la producción de biosurfactantes, como algunos ramnolípidos (Krieg, 1984; Anzai, 2000), también ha sido reportada en esta bacteria, dichas sustancias favorecen la biodisponibilidad de sustancias poco solubles en agua (Thanomsub, 2006).

5.4 Cinéticas de crecimiento con inóculo del biofiltro aclimatado a DCM

Se decidió tomar muestras provenientes del biofiltros y realizar nuevamente cinéticas de crecimiento con los organoclorados antes probados, ya que se esperaba que la comunidad microbiana presentara una mejor adaptación y, por tanto, mayor resistencia a mayores concentraciones de TCE y DCM. En primera instancia solo se probó dicha hipótesis empleando TCE como única fuente de carbono y energía en los cultivos.

En cuanto a la evolución de la biomasa en los experimentos, se pudo comprobar que bajo la presencia de 10 μM TCE la comunidad microbiana conservaba su viabilidad hasta las 40 horas de incubación, obteniendo una concentración máxima de biomasa $3.95 \times 10^6 \pm 1.20 \times 10^6$ UFC/mL a las 93 horas de incubación.

Como puede notarse en la Figura 16, tras haber transcurrido 140 horas de incubación, el cultivo alcanza la etapa de crecimiento estacionario, hecho que confirmó al realizar la determinación de la biomasa 48 horas del último valor reportado (datos no mostrados). Cabe destacar que la concentración de biomasa presente en los tratamientos con 10 μM TCE se encuentra en el mismo orden de magnitud que en los ensayos cinéticos realizados con una concentración cinco veces menor, dicho efecto tiene origen en la adaptación previa del cultivo en el biofiltros a elevadas concentraciones de DCM (200 μM).

Como se mencionó anteriormente, algunas especies microbianas cuentan con sistemas enzimáticos que pueden ser inducidos al incrementar la concentración de contaminante en el medio (Trotsenko, 2009), hecho que pudo permitir la mejor adaptación de los microorganismos a mayores concentraciones de TCE.

Es importante mencionar que, como se mencionó anteriormente, la composición microbiana del "Cultivo A" en el biolavador cambió al término de su operación, fenómeno que pudo resultar en la intrusión de especies microbianas capaces de emplear al TCE como única fuente de carbono, obteniendo así una concentración mayor de biomasa a la reportada en los experimentos del inciso 4.2; al igual que los experimentos anteriores, el pH no fue un factor determinante en el crecimiento, ya que se mantuvo en 7 desde el inicio hasta el fin de la incubación.

5.5 Simulación del proceso aerobio de biodegradación de TCE

Se plantearon dos condiciones en la simulación, la primera de ellas incluyó TCE 10 μM y tolueno en una concentración de 10 mM, se seleccionó tolueno, aun sin ser probado como sustrato en

ningún experimento, ya que es uno de los compuestos más reportados para llevar a cabo la biodegradación cometabólica de TCE (García, 2008). Además, durante la degradación de este compuesto por la enzima tolueno-monooxigenasa, puede ocurrir la degradación cometabólica de organoclorados como TCE (Chang, Alvarez- Cohen, 1995); el estudio de este fenómeno, aunque teórico, brindó una idea de cómo se lleva a cabo este proceso y permitió realizar una comparación con el proceso por oxidación directa. La segunda condición incluyó la misma concentración de TCE; sin embargo, se omitió la presencia de tolueno en el sistema con el fin de emular un proceso de biodegradación por oxidación directa, tal como se esperaría que ocurriera en los experimentos de los incisos 4.2.

En la Figura 25 se observa que al cabo de 7 días el porcentaje de eliminación de TCE en el sistema con tolueno fue de 95%; en contraparte, cuando el sistema no incluyó tolueno, dicho porcentaje solo alcanzó un 55%. Estudios realizados por Van Hylckama, 1997, plantean que durante la oxidación directa de solventes clorados, la viabilidad de las células decrece a la par que aumenta la degradación del organoclorado hasta alcanzar un punto de pérdida total de viabilidad. Alvarez-Cohen, 2001, plantea que la producción de sustancias como epóxidos en ambos mecanismos de degradación afectan de manera directa la actividad enzimática y actúan de manera adversa en los componentes celulares. Es por ello que es necesaria la incorporación de un término que refleje dicho efecto en los modelos cinéticos. Las enzimas oxigenasas generalmente consumen oxígeno molecular y compuestos reductores como NAD(P)H o ubiquinonas durante la oxidación tanto de sustratos generadores de energía como cometabólicos (Rasche, 1991); sin embargo, solo los generadores de energía permiten la regeneración de los compuestos reductores, mientras que los cometabólicos no (Segar, 1995). Esto explica el bajo porcentaje de eliminación en el tratamiento sin tolueno.

Al observar el comportamiento del "Cultivo A" en los experimentos del inciso 4.2, la biomasa presentó una disminución al cabo de 120 horas de incubación, hecho que podría estar relacionado con la deficiente capacidad de emplear TCE como única fuente de carbón por la producción de TCE-époxydo y, al no contar con sustrato como tolueno, los sistemas enzimáticos de oxigenasas de los microorganismos del "Cultivo A" no pudieron actuar eficientemente, provocando así la caída en la producción de biomasa, esto aunado al efecto de disolución de membranas celulares. Como se mostró en la simulación, la introducción de un sustrato como tolueno incrementó la eficiencia de biodegradación.

6. Conclusiones y recomendaciones

Se determinó que el “Cultivo A” es capaz de mantener su viabilidad cuando es expuesto a concentraciones de 2 μM de TCE y 10 μM de DCM; a concentraciones mayores de estos en el medio de cultivo, la biomasa se ve claramente inhibida. Es importante notar que la concentración de DCM fue 5 veces mayor que la de TCE, mientras que la biomasa obtenida para los tratamientos con DCM fue 2.5 veces mayor que la de aquellas expuestas a TCE, por lo que puede afirmarse que la presencia de un compuesto orgánico clorado (alcano) con un número menor de Cl⁻ en su estructura permite una mejor adaptación del cultivo, cuando este se emplea como única fuente de carbono y energía, en contraposición al uso de un cloroetano mayormente clorado.

Los ensayos cinéticos (inciso 4.2) probaron que la utilización de DCM como única fuente de carbono, en una concentración de 2 μM , permite que el “Cultivo A” se mantenga en fase de crecimiento estacionario por un periodo mayor de 7 días de incubación. En contraparte, el “Cultivo A”, al término de 120 horas, redujo su concentración de biomasa por debajo de la inicial; sin embargo, al cabo de 7 días de incubación, esta misma se mantuvo. Al igual que en los experimentos del inciso 4.1, se confirmó que el DCM es una mejor fuente de carbono que el TCE.

La operación del biofiltro (biolavador) con la comunidad microbiana antes mencionada resultó poco exitosa cuando se operó con DCM (40 μM) ya que la biomasa producida fue muy baja 1.4×10^4 UFC/g_{soporte}. Por otra parte, la adición de glucosa al aumento la concentración de biomasa en el soporte; sin embargo, trajo como consecuencia la proliferación de especies microbianas distintas a las originalmente contenidas en el “Cultivo A”, esto aunado a las condiciones de sistema abierto. Sin embargo, al eliminar casi por completo la glucosa y elevar 5 veces la concentración de DCM, aún se contó con una densa concentración de biomasa en el soporte, sugiriendo así la adaptación de las especies microbianas a la presencia de elevadas concentraciones de este organoclorado. Las micrografías y tinciones realizadas al inicio y término de la operación del biolavador, permitieron comprobar que la variación en la composición original del “Cultivo A”; sin embargo, las especies distintas a las de este cultivo podrían resultar benéficas en el proceso de biodegradación de DCM. Resulta evidente que es necesario realizar en futuras investigaciones, identificación por técnicas de biología molecular de los microorganismos del “Cultivo A”, así como de los ajenos, presentes al final de la operación del biolavador. También será necesario probar nuevamente “Cultivo A” en el biolavador garantizando las condiciones de esterilidad y realizar mediciones de la producción de CO₂ para confirmar la mineralización del organoclorado, así como para determinar que su concentración se reduce.

Las muestras tomadas del biofiltro e incubadas nuevamente bajo la presencia de TCE, esta vez en concentraciones 5 veces mayor, 10 μM , demostraron una mejor adaptación del "Cultivo A" a este disolvente, dado que tras 140 horas de incubación, la concentración de biomasa fue de $3.9 \times 10^6 \pm 1.00 \times 10^5$ UFC/mL, diez veces mayor que cuando se expuso a una concentración de TCE de 2 μM . Al igual que en el biofiltro, la composición de comunidad microbiana fue distinta a la probada en los ensayos cinéticos, por lo que será necesario realizar experimentos con este cultivo puro para comprobar que verdaderamente es capaz de adaptarse y crecer a mayores concentraciones de TCE.

La simulación computacional del proceso de biodegradación de TCE con células libres, tomando como microorganismo de referencia a *Pseudomonas cepacia* G4 y un modelo cometabólico de biodegradación de TCE (10 μM), permitió observar que el uso de sustratos de crecimiento como tolueno (u otros como metano) incrementan el porcentaje de eliminación de este disolvente casi al doble que cuando el proceso se lleva a cabo por oxidación directa, ya que es sabido que el uso de sustratos de crecimiento como tolueno permite la regeneración de sustancias reductoras dentro de la células como NAD(P)H, mismas que son empleadas por monooxigenasas en la degradación cometabólica de organoclorados como TCE. Además, tal como se mencionó en la sección 4.5, el modelo podría modificarse adicionando un término que refleje la toxicidad que resulta de la biodegradación de organoclorados con el fin de hacer más certera la simulación.

Finalmente, podemos afirmar que el "Cultivo A" es capaz de utilizar DCM como única fuente de carbono sin perder su viabilidad; en contraparte, el TCE mostró ser un claro inhibidor del crecimiento de esta comunidad microbiana. El uso de un biolavador para eliminar DCM no fue concluyente ya que se operó como un sistema abierto. De igual manera, la adaptación del "Cultivo A" a mayores concentraciones (>2 μM) de TCE no fue concluyente. Para confirmar que existe biodegradación de estos dos compuestos será necesario llevar a cabo análisis cromatográficos, permitiendo así entender el mecanismo de biodegradación que realizan estos microorganismos.

7. Referencias

Aizpuru, A., Malhautier, L., Fanlo, J. 2005. *Biofiltration of a mixture of volatile organic compounds on granular activated carbon*. Biotech and Bioeng Vol. 83 (4): 479 – 488.

Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-014-CNA-2003 Requisitos para la Recarga Artificial de Acuíferos, Comisión Nacional del Agua, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Alfán, R. 2007. *Compuestos de actividad redox para acelerar la biodegradación anaeróbica de Tricloroetileno (TCE)*. Informe técnico. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, México.

Álvarez-Cohen, L.; Speitel, G. 2001. *Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents*. Biodegradation. Vol.12:105-126.

Anzai, Y.; Kim, H.; Park, JY; Wakabayashi, H. 2000. *Phylogenetic affiliation of the Pseudomonas based on 16S rRNA sequence*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Vol. 50: 1563-89.

Bagley, D.; Gossett, J. 1990. *Tetrachloroethene transformation to trichloroethene and cis-1,2-dichloroethene by sulfate reducing enrichment cultures*. Appl. and Environ. Microbiol. Vol.56 (8):2511-2516.

Bailón, L.; Nikolausz, M.; Kästner, M.; Viega, M.; Kennes, C. 2009. *Removal of dichloromethane from waste gases in one- and two-liquid-phase stirred tank bioreactor and biotrickling filters*. Wat. Resr. Vol. 43:11-20.

Bartnicki, E.; Castro, E. 1994. *Biodehalogenation – Rapid Oxidative-Metabolism of Monohalomethanes and Polyhalomethanes by Methylosinus- Trichosporium Ob-3b*. Environ. Toxi. Chem. Vol.13:241-245.

Chang, H.; Alvarez-Cohen, L. 1995. *Model for the cometabolic biodegradation of chlorinated organics*. Environ Sci Tech. Vol 29 (9): 2357-2367.

Coleman, N.; Mattes, T.; Gosset, J.; Spain, J. 2002. *Biodegradation of cis- dichloroethene as the sole carbon source by a β -proteobacterium*. Appl. Environ. Microbiol. Vol.68:2726-2730.

Danko, A.; Luo, M.; Bagwell, C. 2004. *Involvement of linear plasmids in aerobic biodegradation of vinyl chloride*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 7 (10):6092-6097.

Davis, J.; Carpenter, L. 1999. *Aerobic Biodegradation of Vinyl Chloride in Groundwater Samples*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 56: 3878-3880.

Den, Ravindran, V., Pirbazari, M. 2005. *Biofiltration of Chlorinated Volatile Organic Compounds: Laboratory-Scale and Pilot-Scale Studies*. Alche Annual Meeting, Cincinnati, USA.

Dirección General de Normas, *Análisis de aguas-Determinación de ion sulfato NMX-AA-074-1981*.

Distefano, T.; Gossett, J.; Zinder, S. 1991. *Reductive Dechlorination of High Concentrations of Tetrachloroethene to Ethene by an Anaerobic Enrichment Culture in the Absence of Methanogenesis*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 57:2287-2292.

Drzyzga, O.; Gerritse, J.; Gottschal, J. 2001. *Coexistence of sulphate-reducing Desulfovibrio species and the dehalorespiring Desulfitobacterium frappieri TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulphate and tetrachloroethene*. Environ. Microbiol. Vol. 3 (2): 92-99.

Drzyzga, O.; Gottschal, J. 2002. *Tetrachloroethene dehalorespiration and growth of Desulfitobacterium frappieri TCE1 in strict dependence on the activity of Desulfovibrio fructosivorans*. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 68 (2):642-649.

Environmental Protection Agency, US. www.epa.gov

Enzien, M.; Picardal, F. 1994. *Reductive dechlorination of trichloroethylene and tetrachloroethylene under anaerobic conditions in a sediment column*. Appl. Environ. Microbiol. Vol.60:2200-2204.

Eurochlor. Chlorine Online, Unión Europea. 2005. www.eurochlor.org

Fetzner, S. 1998. *Bacterial dehalogenation*. Appl. Microbiol. Biotech. Vol.50:633-657.

Field, J. 2004 *Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds*. Reviews in Environ. Sci. Biotech. Vol.3(3):185-254.

Folsom, B.; Chapman, P. 1991. *Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of TCE by Pseudomonas cepacia G4*. Appl. Environ. Microbiol. Vol.56:1279-1285.

Freedman, D.; Danko, A.; Verce, F. 2001. *Substrate interactions during aerobic biodegradation of methane, ethene, vinyl chloride and 1,2 dichloroethenes*. Wat. Sci. Tech. Vol.43:333-340.

Freedman, D.; Herz, S. 1996. *Use of ethylene and ethane as primary substrates for aerobic cometabolism of vinyl chloride*. Wat. Environ. Res. Vol.68:320-328.

García, M.; Peralta, M. 2008. *Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos*. Rev. Mex. Ing. Quím. Vol7(1):1-12.

German Chemical Society. *Trichloroethylene*. Stuttgart, Hirzel, 1994.

Grbic, D.; Henry, S. 1991. *Influence of endogenous and exogenous electron donors and TCE oxidation toxicity on TCE oxidation by methanotropic cultures from groundwater aquifer*. Microb Ecol. Vol. 20:151-169.

Hägglom, M.; Bossert, I. 2003. *Dehalogenation: microbial processes and environmental applications*. Springerlink.USA.

Halogenated Solvents Industry Alliance, US. www.hsia.org

Hartmans, S. 1992. *Aerobic vinyl chloride metabolism in Mycobacterium aurum L1*. Appl. Environ. Microb. Vol. 58(4):1220-1226.

Henschler, D. *et al.* 1984. *Carcinogenicity study of trichloroethylene, with and without epoxide stabilisers, in mice*. Journal of cancer research and clinical oncology, 107:149-156.

Hiriart, M. *Impactos Ambientales: Acuiferos*, Instituto Nacional de Ecología, México, Marzo 2005.

Hoja Informativa Sobre Sustancias Peligrosas, New Jersey Department of Health and Senior Services, Enero 2002.

Reductive Dechlorination of 1,2 Dichloethane by Methanosarcina barkeri. Journal of Biotechnology. 174:13.

Holliger, C.; Regeard, C.; Diekert, G. 2003. *Dehalogenation by anaerobic bacteria*, p. 115-157. In M. H. Hägglom and I. D. Bossert (ed.), *Dehalogenation: Micro. Proc. Environ. Appli.* Kluwer Academic Press, Boston.

Holliger, C.; Wohlfarth, G.; Diekert, G. 1998. *Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria*. Fems Microbiology Reviews. 22:383-398.

Holliger, C.; Schraa, G. 1994. *Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria*. FEMS Microbiol Rev. 15:297-305.

Instituto Nacional de Ecología, México. www.ine.gob.mx

Kennes, C.; Eldon, R.; Veiga, M.; 2009. *Bioprocesses for air pollution control*. J. Chem. Biotech. Vol. 84:1419-1436.

Kielhorn, J.; Melber, C.; Wahnschaffe, U.; Aitio, A.; Mangelsdorf, I. 2000. *Vynil chloride: Still a cause of concern*. Environ. Heal. Persp. Vol. 108 (7).

Krausova, V.; Robb, F.; González, J. 2003. *Bacterial of dichloromethane in cultures and natural environments*. J. Microbiol. Meth. Vol.53:419-422.

Krieg, N. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1*. Baltimore: Williams & Wilkins.

Lee, E. 2003. *Continuos treatment of gas-phase TCE by Burkholderia cepacia G4 in a two-satage continuos stirred tank reactor/trickling biofilter system*. J. Biosc. Bioeng. Vol. 96(6):572-574.

Leisinger, T.; Braus-Stromeier, A. 1995. *Bacterial growth with chlorinated methanes*. Environ. Heal. Persp. Vol. 103 (5).

McCarty, P.; Rittmann, E. 1981. *Trace organics in groundwater*. Environ Sci Tech. 15:40-51.

McCarty, P. 1997. *Breathing with chlorinated solvents*. Science. 276:1521-522.

McCarty, P. 1998. *Full scale evaluation of in situ cometabolic degradation of TCE in groundwater through toluene injection*. Environ Sci Tech. Vol.32(1):88-100.

McCarty, P. 1999. *Chlorinated organics*. Anderson, Loehr and Smith Eds. American Academy of Environmental Engineers. Annapolis, USA.

Malhuatier, L.; Khammar, N.; Bayle, S. 2005. *Biofiltration of volatile organic compounds*. Appl. Microbio. Biotechnol. 68:16-22.

Malachowski, K.; White, D.; et al. 1993. *Aerobic Mineralization of Trichloroethylene, Vinyl Chloride, and Aromatic Compounds by Rhodococcus Species*. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 60 (2):542-548.

Martinez-Zayas M.; McLeish R. 2005. Dichloromethane degradation. Biotocatalysis/ Biodegradation Database, University of Minnesota, USA.

National Toxicology Program. *Technical report on the carcinogenesis studies of trichloroethylene (without epichlorohydrin) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)*. Research Triangle Park, NC, US Department of Health and Human Services. Report No. TR-243, 1999.

Ramírez, D. 2007. *Control y eliminación de compuestos volátiles provenientes de un digester anaerobio mediante biofiltración*. Tesis de Maestría, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, México.

Rasche, M.; Hyman, M. 1991. *Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by Nitrosomonas europaea. Cometabolic activation of ammonia monooxygenase and substrate specificity*. Appl Environ Microbiol. Vol.57:2986-2994.

Reineke, Walter; Kaschaberk, Stefab. 2002. *Chlorinated Hydrocarbon Metabolism*. Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd.

Reineke, W.; Agathos, S. 2002. *Biotechnology for the environment: Strategy and Fundamentals*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Révész, S.; Sipos, R. 2006. *Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments*. Int. Biodeg. Vol. 58:239-247.

Román, M. 2005. *Guía técnica de Atenuación Natural Monitorizada en emplazamientos contaminados. Técnicas de bioestimulación y bioaumentación para la potenciación de la biodegradación de contaminantes*, Universidad Politécnica de Cataluña, España.

Samprini, L. 1994. *In situ bioremediation of chlorinated solvents*. Environ. Heal. Perps. Vol.103 (5):101-105.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México. www.semarnat.gob.mx

Segar, R.; Speitel, G. 1995. *Cometabolism of chloroethene mixture by biofilms grown on phenol*. Tesis doctoral. University of Texas at Austin, USA.

Tejasen, S. 2004. *Aerobic biotransformation of trichloroethylene, cis-dichloroethylene and vinyl chloride by a mixed culture grown on a non-toxic substrate: Benzyl alcohol*. J. Sci. Tech. Vol 26 (1): 117-129.

Tartakovsky, B.; Manuel, F. 2005. *Degradation of trichloroethylene in a coupled anaerobic-aerobic bioreactor: Modeling and experiment*. Bioch. Engen. J. Vol.26:72-81.

Thanomsub, B.; Pumeechockchai, W.; Kanzaki, H., et al. 2006. *Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa B189 isolated from milk factory waste*. Bioresource Technology. Vol. 98 (5):1149-1153.

Trotsenko, Y.; Torgonskaya, M. 2009. *The aerobic degradation of dichloromethane: Structural-functional aspects (a review)*. Appl. Biochem. Microb. Vol. 45 (3):261-276.

Trueper, H.; Schlegel, H. G. 1964. *Antonie van Leeuwenhoek* 30: 225- 238. NEN 3235.8.3

Van Hylckama, V.; Koning, W.; et al. 1997. *Effect of chlorinated ethane conversion on viability and activity of Methylosinus trichosporium OB3b*. Appl Environ Microbiol. Vol. 62:3304-3312.

Verce, M.; Ulrich, R. 2000. *Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 66:3535-3542.

Vedova, L. 2008. *Biofiltration of industrial waste gases in trickled-bed bioreactor. Trichloroethylene removal*. Tesis Doctoral. Universidad de Padua, Italia.

Wang, J.; Chen, J. 2006. *Removal of dichloromethane from waste gases with a bio-contact oxidation reactor*. Chem. Engen. J. Vol. 123:103-107.

Watts, R. 1997. *Hazardous wastes sources, pathways and receptors*, John Wiley & Sons Inc., USA.

Wilson, J.; Wilson, B. 1985. *Biotransformation of trichloroethylene in soil*. Appl. Environ. Microbiol. Vol.49:242-243

Wise, D. *Environmental Systems: Volume I*. CRC Press, USA, 1987.

Yeager, C.; Bottomley, P. 2001. *Cytotoxicity Associated with Trichloroethylene Oxidation in Burkholderia cepacia G4*. Appl. Environ. Microbiol. Vol.67 (5):2107-2115.

