

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA DISMINUCIÓN DE
CONCENTRACIÓN DE FENOL EN AGUA SINTÉTICA
POR MEDIO DE DOS CONSORCIOS BACTERIANOS
NATIVOS, AEROBIO Y ANAEROBIO FACULTATIVO, A
NIVEL DE LABORATORIO, PARA SU APLICACIÓN
FUTURA EN LA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES
TEXTILES**

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO
DE:**

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

JOHANNA PAMELA MONTENEGRO PUGA

SANGOLQUÍ, 14 de octubre del 2010

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

JOHANNA PAMELA MONTENEGRO PUGA

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. RAFAEL VARGAS

SECRETARIA ACADÉMICA

Abg. VANESA ANDRADE

Sangolquí, 14 de octubre del 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. JOHANNA PAMELA MONTENEGRO PUGA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 14 de octubre del 2010

Lic. Biol. Alma Koch Kaiser, M.Sc.Dra. Blanca Naranjo

DEDICATORIA

Al ser que nos regala cada día para vivirlo con intensidad, Dios.

A mis padres Luis Ernesto Montenegro Córdova y Olga O. Emperatriz Puga Ortega, quienes con su incomparable esfuerzo y dedicación me han apoyado en toda mi carrera universitaria y la vida diaria, mostrandome con claros ejemplos que los grandes esfuerzos y retos tienen sus grandes recompensas.

A mis hermanos Omar^º, Andrés y Jairo y a sus familias que siempre me han ayudado y apoyado en cuerpo o espíritu.

Johanna Montenegro P.

AGRADECIMIENTO

A mis maestros, quienes con mucha sabiduría guiaron mi trabajo. Almita Koch por darme la confianza para poder realizar este trabajo y por enseñarme que nada es difícil, que para todo hay solución y que las cosas se pueden solucionar inmediatamente, por su gran valor humano. Blanquita Naranjo por haberme demostrado que uno es fuerte y que ante cualquier problema se puede salir luchando por la vida, con su constante alegría y exigencias me ha enseñado a crecer como persona y profesional. Al Ing. Pedro Romero por su inmensa ayuda al dirigirme en el análisis estadístico.

Profesionales que formaban parte de la ex – Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica, Ing. Enrique Arévalo e Ing. Paulina Guevara, quienes ayudaron con el espacio y los conocimientos para emprender la investigación.

A Valeria Ochoa Ph.D. docente e investigadora de la Universidad San Francisco de Quito, quien me ayudó con su amplio conocimiento para determinar las tasas de degradación de fenol.

A todos mis amigos de la vida!!! Los del barrio! Los de la U! Los que no son ni del barrio ni de la U! A todos! Porque siempre me han brindado su alegría y apoyo, y ante todo me han aguantado todas mis locuras. Roberto Rodríguez, gracias por ser apoyo y soporte en cada instante, dentro y fuera de la ESPE. Andre C., Pato L., Fer T., Lisu J., Naty S., los mijos inseparables. Diani Guevara, amiga por aguantar tantas cosas, juntas salimos. Fer C. y Mario G. por sus consejos ingenieriles. Diani A. e Iri M. promotoras del proyecto. Caro P., Diana G. y Elenita Q., por soportar mis bromas y locuras. Paty G. y Pato D. mis pasantes. Pauly Q. siempre animándome y ayudandome. Fercho O., Lenin A., Mauro V., Santo P., Carlos C., Luis R., Jorge V. y Anita P., que siempre hemos estado en las buenas y malas. Silvia Escobar, por ayudarme, apoyarme, acolitarme, estar en todo y en todas, gracias amiga mía, por ayudarme en la parte de validación de la investigación y por siempre estar ahí.

Johanna Montenegro P.

Índice de Contenidos

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
Índice de Contenidos	vi
Listado de Tablas.....	ix
Listado de Cuadros	x
Listado de Figuras.....	xi
Listados de Anexos.....	xiii
Abreviaturas	xiv
Resumen	xv
Abstract	xvi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	1
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 Marco teórico	4
1.4.1 Descripción General del Fenol	4
1.4.2 Obtención	5
1.4.3 Usos	6
1.4.4 Propiedades físicas	6
1.4.5 Propiedades químicas.....	7
1.4.6 Exposición y Efectos del fenol en la salud humana	7
1.4.7 Efectos en el medio ambiente	9

1.4.8	Usos de fenol en la industria textil	10
1.4.9	Contaminación de agua por la industria textil en Quito – Ecuador	14
1.4.10	Límites máximos permisibles de descarga de Fenol en Quito – Ecuador.....	14
1.4.11	Método fotométrico directo para determinación de fenol en soluciones acuosas.....	16
1.4.12	Validación de métodos analíticos	16
1.4.13	Tipos de tratamientos para aguas contaminadas con fenol	18
1.4.13.1	Métodos Biológicos.....	18
1.4.13.2	Métodos físico – químicos	23
1.5	Hipótesis.....	28
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		29
2.1	Participantes	29
2.2	Zona de Estudio.....	29
2.3	Período de tiempo de investigación	30
2.4	Diseño Experimental.....	30
2.5	Procedimientos.....	32
2.5.1	Determinación de la concentración de fenol en muestras de aguas residuales de industrias textiles	32
2.5.2	Conorcios bacterianos.....	33
2.5.3	Condiciones de incubación.....	34
2.5.4	Composición del medio de cultivo	34
2.5.5	Determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo ..	36
2.5.6	Validación del método para determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo	37
2.5.7	Determinación de la biomasa en el medio de cultivo.....	39
2.5.7.1	Método de siembra profunda	39
2.5.7.2	Método espectrofotométrico	40

2.5.8	Selección de inóculo con capacidad de degradación de fenol (MS 3)	41
2.5.9	Activación de los inóculos bacterianos	43
2.5.9.1	Activación de los consorcios M 3 e I 5	43
2.5.9.2	Activación consorcio seleccionado MS 3 bajo condiciones aerobias	43
2.6	Análisis de resultados	45
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		46
3.1	Determinación de la concentración de fenol en muestras de aguas residuales de industrias textiles	46
3.2	Validación del método para determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo	47
3.3	Diseño experimental con el consorcio M 3 en condiciones aerobias	49
3.4	Diseño experimental con el consorcio I 5 en condiciones anaerobias	50
3.5	Selección de inóculo con capacidad de degradación de fenol (MS 3)	51
3.6	Activación del consorcio seleccionado MS 3 en condiciones aerobias	52
3.7	Diseño experimental con el consorcio MS 3 en condiciones aerobias	54
3.8	Relación entre controles y tratamientos empleados con el consorcio MS 3	60
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		62
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES		68
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		70
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA		71
ANEXOS		82

Listado de Tablas

Tabla 2.1 Tratamientos del diseño experimental realizados con los tres consorcios nativos compuestos usados en la fase de experimentación de la investigación, por separado.....	31
Tabla 2.2 Controles añadidos al diseño experimental de cada consorcio por separado.	31
Tabla 2.3 Concentraciones de parte de los compuestos añadidos al medio de cultivo mineral tomado de Jiang <i>et al.</i> (2004), modificado por Ayala (2010) y Moncayo (2010).	35
Tabla 3.1 Concentraciones de fenol (mg.L^{-1}) de muestras de aguas residuales de diferentes industrias textiles en la provincia de Pichincha, Ecuador.....	46
Tabla 3.2 Resultados e interpretación de cada parámetro para la validación del método analítico en la determinación de fenol en medio de cultivo. 48	
Tabla 3.3 Tasas de degradación de fenol de los tratamientos que presentaron disminución completa de la concentración de fenol con el consorcio MS 3.....	56
Tabla 3.4 Tiempo (días) cuando cada tratamiento llega al 100% de degradación de fenol con el consorcio MS 3.	57
Tabla 3.5 Intervalos de confianza al 95% de la interacción Fenol (mg.L^{-1}) * Glucosa (mg.L^{-1}), donde la variable dependiente es el porcentaje de degradación de fenol.....	59
Tabla 3.6 Intervalos de confianza al 95% de la interacción Fenol (mg.L^{-1}) * Tiempo (días), donde la variable dependiente es el porcentaje de degradación de fenol.....	60

Listado de Cuadros

Cuadro 1.1 Propiedades físicas del fenol (ATSDR, 2008c).	6
Cuadro 1.2 Efectos del fenol sobre la salud humana (CSRM, 2007; ATSDR, 2008a).	9
Cuadro 1.3 Límites máximos permisibles de descarga de fenol a diferentes cuerpos receptores de agua, tabla tomada de Libro VI, Recurso Agua, Anexo 1, de la República del Ecuador (2002).	15
Cuadro 1.4 Definición de parámetros que debe cumplir el método analítico para poder ser validado (ASECAL, 2005).	17
Cuadro 2.1 Parámetros y objetivos para validar el método de determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo (ASECAL, 2005).	38

Listado de Figuras

Figura 1.1 Estructura química del Fenol, figura tomada y modificada de ATSDR (2008c).	5
Figura 1.2 Diagrama del proceso productivo y residuos que genera la industria textil (caso algodón), letras en color rojo señalan la salida de fenoles, figura tomada y modificada de CEPIS (1994).	13
Figura 1.3 Vía metabólica para la biodegradación de fenol en condiciones aerobias (Bajaj <i>et al.</i> , 2008b).	20
Figura 1.4 Posible sistema de reactor en dos etapas para tratamiento de altas concentraciones de fenol (Rittmann & McCarty, 2001).	21
Figura 1.5 Degradación de fenol a través de la vía de la ciclohexanona (Fang <i>et al.</i> , 2006).	22
Figura 2.1 Esquema de diluciones y procedimiento del método de siembra profunda, tomado y modificado del Manual de Laboratorio de Microbiología General de Benson's (2007).	40
Figura 3.2 Curva promedio de calibración para la determinación de concentraciones de fenol de cada unidad experimental de los tres consorcios (M 3, I 5 y MS 3).....	47
Figura 3.3 Consorcio bacteriano M 3 bajo condiciones aerobias. (A) Biomasa celular, (B) Concentración de fenol (mg.L^{-1}).....	49
Figura 3.4 Consorcio I 5 bajo condiciones anaerobias. (A) Biomasa celular, (B) Concentración de fenol (mg.L^{-1}).....	50
Figura 3.5 Concentración de fenol y biomasa celular durante la degradación de fenol, del frasco 2, usando el consorcio M 3 bajo condiciones aerobias.	51
Figura 3.6 Medición de concentraciones de fenol (mg.L^{-1}) durante 20 días de incubación, con una concentración inicial de fenol de 200 mg.L^{-1} y 5 % de inóculo. (A) Inóculo M 3, (B) Inóculo I 5.	52
Figura 3.7 Concentración de fenol y biomasa celular durante la degradación de 200 mg.L^{-1} de fenol, del consorcio MS 3 bajo condiciones aerobias, durante 35 días de incubación.	53

Figura 3.8 Crecimiento del consorcio MS 3 en medio de cultivo libre de fenol con 5 g.mL ⁻¹ de glucosa, durante 5 días de incubación.	53
Figura 3.9 Concentración de fenol y biomasa celular del tratamiento T5 (400 mg.L ⁻¹ Fenol) y, concentración de fenol y biomasa celular del tratamiento T6 (400 mg.L ⁻¹ Fenol + 200 mg.L ⁻¹ Glucosa).....	55
Figura 3.10 Tratamientos que presentaron completa degradación de fenol. (A) Aumento de la biomasa, (B) Disminución de la concentración de fenol	56
Figura 3.11 Porcentaje de degradación de fenol con los cuatro tratamientos que presentaron completa disminución en concentración de fenol.....	58
Figura 3.12 Medias marginales estimadas de porcentaje de degradación de fenol con 10 mg.L ⁻¹ y 100 mg.L ⁻¹ , en relación a 0 mg.L ⁻¹ y 200 mg.L ⁻¹ de glucosa en función del tiempo de incubación.	58
Figura 3.13 Medias marginales estimadas del porcentaje de degradación de fenol, a cualquier tiempo de incubación, tomando en cuenta concentraciones iniciales de fenol con 0 y 200 mg.L ⁻¹ de glucosa. ...	59
Figura 3.14 Medias marginales estimadas del porcentaje de degradación de fenol a cualquier concentración de glucosa, tomando en cuenta concentraciones iniciales de fenol y días de incubación.	60
Figura 3.15 Comparación entre la degradación de fenol en el tratamiento T3, 100 mg.L ⁻¹ Fenol con 5% de biomasa y su respectivo control, en ausencia de biomasa.	61

Listados de Anexos

Anexo A. Preparación de soluciones para la determinación de la concentración de fenol en agua y medio de cultivo por medio del método fotométrico directo (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 5530, 1998)	82
Anexo B. Ecuaciones de las curvas de calibración con sus respectivos R^2 , para la determinación de la concentración de fenol en muestras de aguas residuales de diferentes industrias textiles en la provincia de Pichincha, Ecuador.	83
Anexo C. Curvas estándar para la validación del método para determinación de la concentración de fenol	84
Anexo D. Curva promedio de calibración para realizar los cálculos de concentración de fenol en todas las unidades experimentales con los tres consorcios (M 3, I 5 y MS 3) y la validación del método analítico.	84

Abreviaturas

M 3	Consortio bacteriano en condiciones aerobias - consorcio aerobio
I 5	Consortio bacteriano en condiciones anaerobias - consorcio anaerobio facultativo
MS 3	Consortio bacteriano seleccionado en condiciones aerobias
MTBE	metil-terbutil-éter
DBO	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
ATSDR	Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (siglas en inglés) de Estados Unidos
EPA	La Agencia de Protección Ambiental (siglas en inglés) de Estados Unidos
D.O.	Densidad óptica
D.O._{600nm}	Densidad óptica o absorbancia a una longitud de onda de 600nm
mg.L⁻¹	Miligramos por litro
g.L⁻¹	Gramos por litro
UFC.mL⁻¹	Unidades Formadoras de Colonias por mililitros
T1	Tratamiento 1: 10 mg.L ⁻¹ de Fenol
T2	Tratamiento 2: 10 mg.L ⁻¹ de Fenol + 200 mg.L ⁻¹ de Glucosa
T3	Tratamiento 3: 100 mg.L ⁻¹ de Fenol
T4	Tratamiento 4: 100 mg.L ⁻¹ de Fenol + 200 mg.L ⁻¹ de Glucosa
T5	Tratamiento 5: 400 mg.L ⁻¹ de Fenol
T6	Tratamiento 6: 400 mg.L ⁻¹ de Fenol + 200 mg.L ⁻¹ de Glucosa

Resumen

La presente investigación evaluó la disminución de concentración de fenol en agua sintética, se usó dos consorcios bacterianos nativos, bajo condiciones aerobias y anaerobias. Este trabajo se lo realizó debido a la contaminación ambiental que representa el fenol en las descargas de aguas residuales de varias industrias como es la textil. A partir del inóculo M 3 se seleccionó un consorcio con capacidad de degradación de fenol en condiciones aerobias, al cual se lo llamó MS 3 y se aplicó el diseño experimental. Se presentó degradación completa de fenol en los tratamientos con 10 y 100 mg.L-1 de fenol y sus combinaciones con 0 y 200 mg.L-1 de glucosa. En la concentración de 400 mg.L-1 de fenol y sus combinaciones 0 y 200 mg.L-1 de glucosa, la concentración de fenol permanece constante; sin embargo, el consorcio demostró ser tolerante. La tasa de degradación de fenol fue mayor al suplementar el medio de cultivo con glucosa. El tiempo de degradación de fenol más bajo perteneció a la menor concentración de fenol (10 mg.L-1) y mayor concentración de glucosa (200 mg.L-1). El consorcio bacteriano MS 3 es capaz de degradar completamente fenol en aguas residuales de industrias textiles en concentraciones menores a 100 mg.L-1.

Abstract

This study evaluated the phenol concentration decrease in synthetic water, for this two native bacterial consortium under aerobic and anaerobic conditions were used. This study was realized because phenol represents environmental pollution in the wastewater unloads of several industries specially the textile. From the consortium M 3 was selected a consortium able to degrade phenol under aerobic condition, which was called MS 3 and to which the experimental design was applied. The treatment with 10 and 100 mg.L⁻¹ of phenol and their combination of 0 and 200 mg.L⁻¹ of glucose degraded completely the phenol. At the concentration of 400 mg.L⁻¹ of phenol and their combination of 0 and 200 mg.L⁻¹ of glucose, the phenol concentration remains constant, however the consortium demonstrated to be tolerant. A higher phenol degradation rate was obtained when glucose was added to the medium. The lowest degradation time of phenol was with the lower phenol concentration (10 mg.L⁻¹) and higher glucose concentration (200 mg.L⁻¹). The consortium MS 3 is able to degrade completely the phenol in wastewater from textile industries at concentrations below 100 mg.L⁻¹.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La contaminación del agua debido a descargas industriales es un problema cada vez mayor. La estabilidad de algunos anillos aromáticos hace que estos compuestos sean resistentes a su degradación en el medio ambiente y que se conviertan en contaminantes muy persistentes (Hughes & Cooper, 1996).

El fenol es un compuesto aromático que suele ser descargado de industrias farmacéuticas, textiles, papel, solventes de pinturas, pesticidas, colorantes, plásticos, explosivos, herbicidas, refinería de petróleo, resinas, plantas químicas y petroquímicas, entre otros (Moussavi *et al.*, 2009; Patel & Rajkumar, 2009; Varma & Gaikwad, 2009).

Al formar parte de los contaminantes que prevalecen en el medio ambiente por su difícil biodegradación, los fenoles son considerados tóxicos y como uno de los mayores contaminantes peligrosos para los organismos pues aún en concentraciones bajas pueden causar daño a la salud humana (Huang *et al.*, 2007). Por otro lado, el fenol causa también efectos adversos sobre el medio ambiente, pues puede alterar el ecosistema acuático y destruir importantes recursos naturales (Moussavi *et al.*, 2009).

1.2 Justificación del problema

Las aguas residuales industriales son descargadas en riachuelos, ríos, lagos y suelos, representando un serio problema ecológico por su amplio uso y alta concurrencia en el ambiente (Agarry & Solomon, 2008).

La Agencia de Protección Ambiental (con sus siglas en inglés, EPA) de los Estados Unidos ha definido al fenol como un compuesto contaminante desde 1979; por otro lado, la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (con sus siglas en inglés, ATSDR) ha reportado los efectos adversos que presenta la ingestión de fenol en la salud humana, mencionando que puede causar la muerte al ingerir cantidades de 1 a 32 g. La baja volatilidad del fenol y su solubilidad con el agua hacen que el consumo de agua contaminada sea un gran peligro en la salud (Prpich & Daugulis, 2005; Agarry & Solomon, 2008).

Además de ser un compuesto tóxico para los seres humanos, es una amenaza tanto para la vida acuática como para la terrestre, pues su presencia en diversos ambientes impide un desarrollo adecuado de organismos que viven en estos medios, causando alteraciones en el ecosistema (Annachatre & Gheewala, 1996). Por lo tanto, es necesario eliminar el fenol de efluentes industriales antes de ser descargados al medio ambiente (Kanekar *et al.*, 1999; Suárez *et al.*, 2007).

Existen varias técnicas que han sido usadas para remover fenol de aguas residuales industriales contaminadas, entre ellos físicos, químicos y biológicos. Los procesos biológicos, como es la biodegradación, han recibido mayor atención debido a que son amigables con el ambiente (Agarry & Solomon, 2008). Además, al trabajar con tratamientos biológicos se evita los problemas secundarios en los efluentes, como es el caso de los tratamientos fisicoquímicos, en los que se generan compuestos secundarios potencialmente más tóxicos que el propio contaminante (Hidalgo *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2007; Saravanan *et al.*, 2008a). Actualmente, existen varios estudios relacionados con la biodegradabilidad de fenol, aplicando tanto procesos aerobios como anaerobios (Bajaj *et al.*, 2008a; Lin *et al.*, 2009).

La biorremediación permite que los microorganismos transformen o degraden compuestos peligrosos en agua y suelos (Muñoz *et al.*, 2001). Muchas bacterias son capaces de usar los compuestos aromáticos como el

fenol como única fuente de carbono y energía (Jiang *et al.*, 2004). Sin embargo, uno de los problemas que representa trabajar con fenol como única fuente de carbono, es que el crecimiento microbiano puede sufrir una inhibición con el sustrato, debido a que es usado en altas concentraciones; para combatir este problema se puede colocar una fuente convencional de carbono, como la glucosa, extracto de levadura o glutamato de sodio. Este tipo de compuestos incrementan la tolerancia celular al sustrato, mejorando además la biodegradación de fenol. Otros métodos pueden ser modificar microorganismos genéticamente, inmovilizar células y adaptar gránulos de células a altas concentraciones de fenol (Mamma *et al.*, 2004).

Muchas especies han sido aisladas y caracterizadas como organismos degradadores de fenol, tales como *Pseudomonas*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis* y *Candida tropicalis*. Sin embargo, es necesario trabajar con comunidades microbianas nativas compuestas, puesto que son capaces de realizar una mineralización completa de fenoles, transformándolos a anhídrido carbónico (CO₂) y Agua(H₂O) sin ningún residuo tóxico (Saravanan *et al.*, 2008a). Otra ventaja de trabajar con consorcios microbianos es mantener la estabilidad en el cultivo e incrementar sus capacidades metabólicas (Ambujom, 2001).

Existen varios trabajos relacionados con la biorremediación de aguas contaminadas con fenol a nivel mundial. Es indispensable llevar a cabo estudios propios para la determinación de consorcios eficientes que estén bien adaptados a las condiciones en las que van a cumplir su función y que no representen un peligro para el ecosistema.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la disminución de concentración de fenol en agua sintética por medio de dos consorcios bacterianos nativos, aerobio y anaerobio facultativo, a nivel de laboratorio, para su aplicación futura en la biorremediación de efluentes textiles.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Activar metabólicamente los inóculos bacterianos nativos compuestos proporcionados por el cepario del Laboratorio de Microbiología de la ESPE.
- Seleccionar un inóculo con capacidad de degradación de fenol.
- Determinar si existen diferencias significativas al aplicar diferentes concentraciones de fenol y glucosa, como fuentes de carbono.
- Analizar la relación entre la biomasa y disminución de la concentración de fenol.
- Cuantificar la concentración de fenol en cada unidad experimental a través de métodos espectrofotométricos.
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos.
- Validar el método para determinación de concentración de fenol en medio de cultivo.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Descripción General del Fenol

La ATSDR de los Estados Unidos (2008b), describe al fenol como un sólido incoloro a blanco cuando se encuentra en forma pura. A temperatura

ambiente, tiene una presión de vapor baja y es una masa cristalina clara o ligeramente rosada, polvo blanco o líquido espeso. Es muy soluble en alcohol y ligeramente soluble en agua (CSRM, 2007).

El fenol en su preparación comercial es un líquido que se evapora más lentamente que el agua. Su olor es alquitranado y dulce (ATSDR, 2008b).

La fórmula química del fenol es C_6H_5OH (BASF, 2009) y su estructura química se muestra en la Figura 1.1.



Figura 1.1 Estructura química del Fenol, figura tomada y modificada de ATSDR (2008c).

1.4.2 Obtención

El fenol es un sustancia que se obtiene natural o manufacturada químicamente (ATSDR, 2008b), por destilación fraccionaria del alquitrán de hulla y también de cresoles (Morrison & Boyd, 1998; Consejería de Sanidad Región de Murcia, 2007), además es sintetizado usando hidroperóxido de cumeno, ácido benzoico y clorobenceno (Kanekar, 1999).

La mayor cantidad de fenol producida es sintética; como por ejemplo, es obtenido por la fusión del bencenosulfonato de sodio con álcali, el llamado proceso de Dow (el clorobenceno reacciona con hidróxido de sodio acuoso a $360^{\circ}C$). Así también, se lo puede obtener a partir de cumeno (Morrison & Boyd, 1998).

La producción de fenol alrededor del mundo se encuentra en una tasa de 6 millones de toneladas por año. La síntesis de cumeno y los procesos de

oxidación consisten en la síntesis simultánea de fenol y acetona, produciendo alrededor del 95% de fenol usado en el mundo (Busca *et al.*, 2008).

1.4.3 Usos

El fenol es usado como material sin procesar en la manufactura de una variedad de químicos incluyendo colorantes, desinfectantes y resinas sintéticas incoloras o ligeramente coloreadas, como reactivo en análisis químicos y como un agente antimicrobiano (Kanekar, 1999).

Tanto fenol como componentes fenólicos son comúnmente encontrados en efluentes de procesos industriales, por ejemplo es usado en refinerías (6 – 500 mg.L⁻¹), plantas petroquímicas (2.8–1220 mg.L⁻¹), plantas de cerámica, manufacturación de textiles, fungicidas y herbicidas (Rigo & Alegre, 2004; Tziotzios *et al.*, 2005; Busca *et al.*, 2008; Saravanan *et al.*, 2008a; Moussavi *et al.*, 2009). Otras fuentes de agua residual que contienen fenoles son las industrias farmacéutica, producción de plásticos, productos de madera, pinturas, pulpas y papel, con cargas de 0.1–1600 mg.L⁻¹ (Busca *et al.*, 2008).

1.4.4 Propiedades físicas

Las propiedades físicas del fenol se describen en el cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Propiedades físicas del fenol (ATSDR, 2008c).

Propiedad	Valor
Peso molecular	94.11
Estado físico	Sólido
Color	Sin color a un rosado bajo
Olor	Aromas definidos, algo repugnante, dulce y picante.
Punto de ebullición	181.75°C
Punto de fusión	43°C 40.9°C (material ultrapuro)

Solubilidad	<p style="text-align: center;">Agua: $8.28 \times 10^4 \text{ mg.L}^{-1}$ a 25°C</p> <p>Solventes Orgánicos: Soluble en agua y etanol, muy soluble en éter, miscible con acetona y benceno.</p>
pH	4.8-6.0 al 5% en agua

El punto de fusión de los fenoles más sencillos es bajo, estos pueden ser líquidos o sólidos; sus puntos de ebullición son elevados, debido a que forman puentes de hidrógeno (Morrison & Boyd, 1998).

1.4.5 Propiedades químicas

La estructura química del fenol (Figura 1.1) nos muestra que posee un anillo bencénico y un grupo hidroxilo sustituyendo uno de los átomos de hidrógeno propios del benceno (C_6H_6). La presencia del anillo bencénico permite que el fenol tenga la capacidad de estabilizarse y esto puede producir que pierda con relativa facilidad el hidrógeno de su grupo hidroxilo, permitiendo que se comporte como un ácido débil (WHO, 1994; Ahumada y Gómez, 2009).

El fenol es sensible a agentes oxidantes. Puede sufrir múltiples reacciones de sustitución electrofílica, como por ejemplo, halogenación y sulfonación. Además, reacciona con compuestos carbonílicos, en medio ácido y básico. La formación de resinas fenólicas son producto de la hidroximetilación con la subsecuente condensación del fenol en presencia de formaldehído. Así mismo, el fenol puede quemarse en presencia de oxígeno y producir monóxido de carbono (CO) como producto de combustión incompleta, siendo éste último un gas tóxico (WHO, 1994; Morrison & Boyd, 1998).

1.4.6 Exposición y Efectos del fenol en la salud humana

La exposición al fenol puede darse por algunas vías, las mismas que representan afectaciones a la salud humana. El fenol es un compuesto corrosivo y causa quemaduras en el sitio de contacto (CSRM, 2007; ATSDR, 2008c).

El fenol inhalado es absorbido rápida y significativamente por los pulmones, llevando a una toxicidad sistemática. A causa de su baja volatilidad, el peligro de inhalación a temperatura ambiente es limitado. Puede provocar síntomas no inmediatos como son: quemazón, tos, vértigo, dolor de cabeza, náuseas, jadeo, vómitos y pérdida del conocimiento (IHCP, 2006; CSRSM, 2007).

Si el fenol es ingerido accidentalmente, causa dolor abdominal, convulsiones, diarrea, dolor de garganta y coloración oscura de la orina. Se han descrito muertes en adultos después de ingerir 1 g (CSRSM, 2007). Una ingestión continua de fenol en concentraciones entre 10 y 240 mg.L⁻¹, por prolongados períodos de tiempo, causa irritación bucal, diarrea, orina oscura; su concentración letal en sangre es de 4.7 a 130 mg.100 mL⁻¹ (Kumaran & Paruchuri, 1997).

El contacto con la piel es la principal vía de exposición tóxica al fenol. El vapor y líquido son absorbidos fácil y rápidamente a través de la piel causando quemaduras cutáneas graves, efecto anestésico local, convulsiones, shock, colapso, coma o muerte. Incluso soluciones diluidas (< 2%) pueden causar quemaduras graves si el contacto es prolongado. Si el fenol toma contacto con los ojos, puede existir pérdida de visión y quemaduras graves (CSRSM, 2007).

En todos los sitios de contacto oral, estomacal, dérmico u ocular, el fenol puede causar serias quemaduras con una destrucción irreversible del tejido (BASF, 2009). En el cuadro 1.2 se resume los efectos que puede tener el fenol frente a los sistemas del ser humano.

Cuadro 1.2 Efectos del fenol sobre la salud humana (CSRM, 2007; ATSDR, 2008a).

Sistema del ser Humano	Efecto del Fenol
Sistema Nervioso Central (SNC)	Este sistema se deprime, causa pérdida de la conciencia, ataques, depresión respiratoria y coma.
Sistema respiratorio	Exposiciones leves pueden causar irritación del tracto respiratorio superior. Exposiciones más serias pueden causar inflamación de la garganta y traquea, ulceración de la traquea y edema pulmonar.
Sistema cardiovascular	Causa inicialmente elevación en la presión sanguínea, después progresivamente baja la presión y causa un shock. Arritmia cardíaca y bradicardia.
Sistema gastrointestinal	Por cualquier vía de exposición el fenol causa comúnmente náusea, vómito y diarrea. Si se ingiere causa daño a la boca, garganta, esófago y estómago. La ingestión puede conducir a la muerte por un fallo respiratorio.
Sistema renal	Fallo renal agudo y desequilibrio ácido-base.
Sistema ocular	Inflamación del ojo y del párpado. Puede nublarse la superficie del ojo.
Sistema dérmico	Si es aplicado directamente, puede dejar manchas color marrón. Al mantener fenol sobre la superficie de la piel, penetra rápidamente y causa muerte celular y gangrena. Si es expuesto en más de 100 cm ² de piel, existe un riesgo de muerte inmediata.

El fenol no ha sido clasificado por efectos carcinogénicos; sin embargo, puede ser un promotor de tumores. De la misma manera, no se han reportado efectos en el desarrollo o reproducción a causa del fenol en humanos (ATSDR, 2008a). En estudios con animales, el fenol ha sido reportado como embriotóxico y fetotóxico, pero no teratogénico (ATSDR, 2008c).

1.4.7 Efectos en el medio ambiente

Naturalmente el fenol se forma por la descomposición de materia orgánica. Su incremento ambiental se ve reflejado por la quema de bosques (WHO, 1994). Sin embargo, la mayor cantidad de fenol es liberado al ambiente a causa de la actividad industrial y la comercialización de productos que lo contienen (WHO, 1994; ATSDR, 2008b,c).

La combustión que se produce por automóviles también libera fenol a la atmósfera. El fenol pasa al agua y suelos desde el aire por deposición húmeda. Una vez en el suelo, se puede mover por lixiviación con ayuda de la lluvia, llegando a las aguas subterráneas. La evaporación de fenol en agua es lenta (WHO, 1994).

El fenol no muestra bioacumulación significativa (IPCS, 1994). Al ser descargado en cuerpos de agua representa riesgo frente a organismos acuáticos. La EPA determinó un nivel de preocupación de fenol de $0.02 \mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO, 1994). En concentraciones de 5 a 25mg.L^{-1} puede ser tóxico y/o letal para los peces (Annachhatre & Gheewala, 1996).

En concentraciones bajas, el fenol no permanece ni en el aire, ni en el suelo o el agua superficial, esto se debe a que reacciona fotoquímicamente en el aire y en el agua superficial y puede ser biodegradado aeróbica y anaeróticamente tanto en el agua como en el suelo (WHO, 1994).

1.4.8 Usos de fenol en la industria textil

El proceso textil consta básicamente de proceso de encolado, desencolado, lavado, blanqueado, mercerizado y teñido (Dos Santos, 2007).

El encolado es el primer paso de preparación, en el cual son adheridos agentes de colado como almidón, alcohol polivinil (PVA) y carboximetil celulosa para proveer fuerza a las fibras y minimizar roturas. El desencolado es empleado después de remover los materiales de encolado, antes de pasar al

proceso de tejido. El lavado remueve impurezas de las fibras; en este proceso se usa una solución de álcali (comúnmente hidróxido de sodio) para romper aceites naturales, grasas, ceras y surfactantes. En el proceso de blanqueado se usan químicos como el hipoclorito de sodio (NaClO) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), los cuales son usados para remover el color indeseado de las fibras (Dos Santos, 2007).

El mercerizado es un proceso químico continuo usado para incrementar la capacidad de teñido, lustre y aspecto de fibra. En este paso una solución alcalina concentrada es aplicada y se lavan las fibras con una solución ácida antes del proceso de teñido. Finalmente, el teñido, sirve para adherir color a las fibras, proceso que requiere de altos volúmenes de agua tanto para el baño de teñido, como para el enjuague. Dependiendo del proceso productivo, muchos químicos tales como metales, sales, surfactantes, auxiliares orgánicos, sulfuros y formaldehídos, pueden ser añadidos para mejorar la adsorción del colorante sobre las fibras (Dos Santos, 2007).

Distintos tipos de fenoles se usan en varios de los procesos textiles, generalmente son usados en el proceso de teñido y acabados funcionales.

El rojo fenol puede ser usado como un colorante textil (Fritschi *et al.*, 2004). Sin embargo, el fenol es más utilizado como un auxiliar en el proceso de teñido, el cual mejoraría la adsorción del colorante al tejido, aquí actúan fenil, fenoles y bencenos clorinados (Hendrickx&Boardman, 1995). Otro tipo de auxiliares para el teñido son los derivados de éter de alquil fenoles, los cuales actúan como igualadores retardantes. Estos compuestos forman complejos agregados de poca estabilidad con las moléculas de colorante, que se van descomponiendo, liberando moléculas individuales de colorante a medida que se modifican factores externos como pH, temperatura, entre otros. Los fenoles son usados también con colorantes aniónicos para la tintura de fibras poliéstericas a temperaturas entre 125 – 135 °C; y aún a estas temperaturas conservan sus propiedades detergentes, dispersantes y tensoactivas. En este

proceso de tintura, dispersan las sustancias sólidas o los colorantes precipitados o coagulados (DAMA, 2010).

Otros auxiliares son llamados “carriers” o acelerantes de teñido, los cuales conforman compuestos fenólicos como *orto* y *para* fenil fenol, ésteres fenólicos solos o en mezclas de dimetil tereftalato y metil silicilato de benzanilida, entre otros. La gran carga fenólica contaminante ha hecho que el uso de dichos productos sea prohibido, es por esto que es importante escoger colorantes de fácil penetración y montaje en la fibra (DAMA, 2010).

Uno de los mayores problemas de la industria textil se encuentra asociado con los surfactantes, emulsificantes y dispersantes; que contienen fenoles. Los surfactantes son ampliamente utilizados en especial para mejorar la solubilidad y dispersión de los químicos en el agua. También para asegurar una rápida humectación y mejorar la penetración de químicos y tintes. Los surfactantes mejoran la humectación de tela porque reducen la tensión superficial; esto es una característica que hace que los surfactantes sean tóxicos para la vida acuática. La toxicidad del surfactante es fuertemente influenciada por su biodegradabilidad. Los surfactantes relacionados con el fenol son el nonilfenol y alquifenoletoxilato (Hendrickx&Boardman, 1995).

Los productos de acabado como las resinas, son usadas para acabados especiales, contienen químicamente fenoles y formaldehídos que contaminan los efluentes y disminuyen la resistencia de la fibra. Además, se encuentran incluidos en este grupo los fijadores, los cuales mejoran la solidez del tejido pero contiene formaldehído y fenoles (DAMA, 2010). Otros productos de acabado son los fenoles clorados o sales metálicas de zinc y cobre, que son usadas como bacteriostáticos y resistencia al moho, además de que evitan los olores, prolongan la vida del tejido (ACERCAR, 2004).

La Figura 1.2 muestra algunos contaminantes potenciales del proceso productivo del algodón; donde, como producto del teñido, enjuague y acabados se puede observar la salida de fenoles.

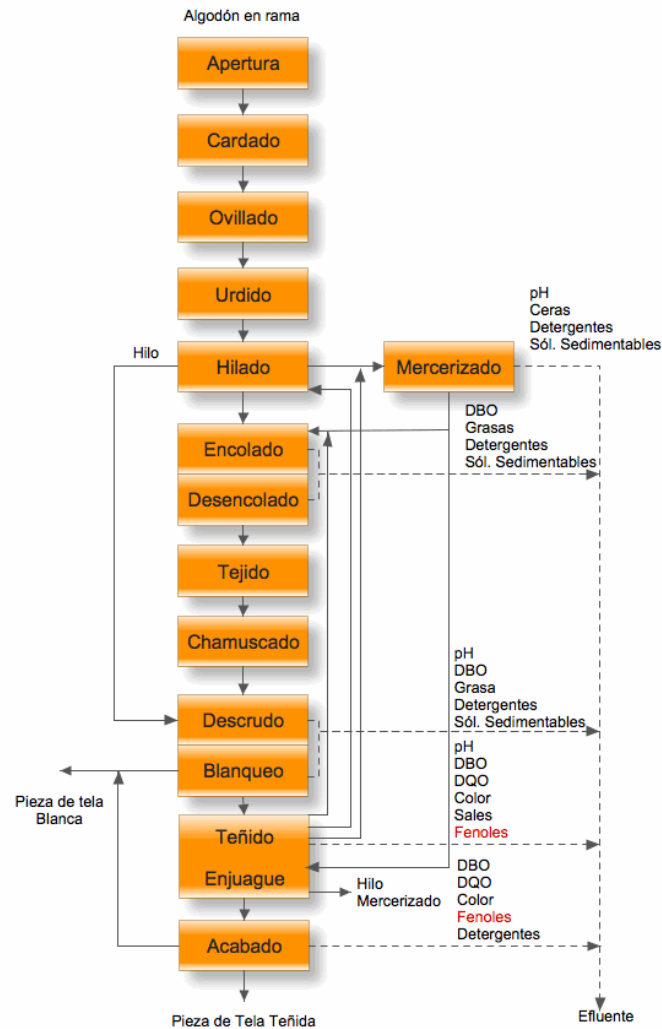


Figura 1.2 Diagrama del proceso productivo y residuos que genera la industria textil (caso algodón), letras en color rojo señalan la salida de fenoles, figura tomada y modificada de CEPIS (1994).

Los químicos y colorantes usados en la industria textil son desarrollados para ser resistentes a influencias del ambiente. Como resultado, son difíciles para remover de aguas residuales generadas durante el proceso

de teñido. La mejor manera para reducir el impacto que causan estos químicos es reducir la cantidad utilizada en cada tratamiento (Hendrickx&Boardman, 1995).

1.4.9 Contaminación de agua por la industria textil en Quito – Ecuador

La industria textil (textiles, prendas de vestir y cueros) ha predominado en Quito – Ecuador desde la década de los cincuenta y fue aumentando su actividad considerablemente, pues se habla que en la década de los ochenta cubrió el 22.9% de actividad industrial, siendo la mayor junto con los productos metálicos, maquinaria y equipos que fueron el 23.2% (Da Ros, 1995).

Da Ros en 1995, dice que las industrias más contaminantes en Quito son la textil, la química y la de galvanizado. La industria textil genera altas cantidades de aguas residuales representando un promedio de 3 655 m³/mes, con un mínimo de descarga de 25 m³/mes y un máximo de 13 420 m³/mes.

Las aguas residuales de la industria textil aportan altas cantidades de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y Demanda Química de Oxígeno (DQO), con 24% y 17%, respectivamente. Los sólidos en suspensión (SS) son el 47% y los metales pesados son el 20% (Da Ros, 1995). Actualmente no existen estudios donde se reporten las cantidades de DBO, DQO y SS de varias industrias textiles.

1.4.10 Límites máximos permisibles de descarga de Fenol en Quito – Ecuador

Según la Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua del libro VI, anexo 1, de la República del Ecuador (2002), los límites máximos permisibles de descarga de fenol a diferentes cuerpos receptores de agua se resumen en el cuadro 1.3.

Cuadro 1.3 Límites máximos permisibles de descarga de fenol a diferentes cuerpos receptores de agua, tabla tomada de Libro VI, Recurso Agua, Anexo 1, de la República del Ecuador (2002).

Cuerpo receptor		Parámetro	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieren tratamiento convencional		Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.002
Aguas de consumo humano y uso doméstico que únicamente requieran desinfección		Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.002
Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en:	Agua fría dulce	Fenoles	Fenoles	mg.L ⁻¹	0.001
	Agua cálida dulce	Fenoles	Fenoles	mg.L ⁻¹	0.001
	Agua marina y de estuario	Fenoles	Fenoles	mg.L ⁻¹	0.001
Aguas subterráneas, considerando un suelo con contenido de arcilla entre (0-25,0) % y de materia orgánica entre (0 - 10,0)%.		Fenol	--	µg.L ⁻¹	1000
Aguas destinadas para fines recreativos		Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.002
Sistema de alcantarillado público		Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.200
Cuerpo de agua dulce		Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.200
Cuerpo de agua marina		Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.200

La EPA de los Estados Unidos, ha fijado una concentración de una parte por billón (1 µg.L⁻¹) de fenol en aguas superficiales.

Por otro lado, en Italia, la Unión Europea acuerda que el límite de fenoles en agua potable y mineral es de $0.5 \mu\text{g.L}^{-1}$. El límite de emisiones de fenol en agua residual son de 0.5 mg.L^{-1} para aguas de superficie y 1 mg.L^{-1} para sistemas de alcantarillado.

1.4.11 Método fotométrico directo para determinación de fenol en soluciones acuosas

Este método colorimétrico utiliza la 4-aminoantipirina que define al fenol, fenoles sustituidos en *orto* y *meta* y, bajo condiciones adecuadas de pH, fenoles sustituidos en *para*, con sustituyentes: carboxilo, halógeno, metoxilo o ácido sulfónico. Este método no determina fenoles sustituidos en posición *para* con grupos: alquilo, arilo, nitro, benzoilo, nitroso o aldehído.

La cantidad mínima detectable es de $10 \mu\text{g}$ de fenol cuando se utiliza una célula de 5 cm y 100 mL de muestra (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998).

1.4.12 Validación de métodos analíticos

En los laboratorios es importante demostrar que los métodos analíticos utilizados proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad o propósito perseguido, puesto que muchas de las decisiones que se toman se basan en la información que dichos resultados aportan (Maroto, 2002).

Para poder validar un método analítico, que en el caso de esta investigación es la determinación de concentración de fenol en medio de cultivo, es necesario cumplir con ciertos parámetros o criterios de calidad. Por lo tanto, validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, es decir, su adecuación a determinados parámetros que han sido establecidos previamente por el usuario, para resolver un problema analítico particular (Maroto, 2002). El cuadro 1.4 muestra los parámetros que debe cumplir el método analítico para que pueda ser validado.

Cuadro 1.4 Definición de parámetros que debe cumplir el método analítico para poder ser validado (ASECAL, 2005).

Parámetro	Definición
Linealidad / Función de respuesta	Es una función de respuesta en la cual los datos del blanco y estándares se ajustan a una recta. Se estima el grado de ajuste de la recta, R^2 , el cual debe ser mayor a 0.99.
Límite de detección (LD)	Se calcula a partir de los datos obtenidos del blanco, convertidos a resultado final sobre muestra.
Límite de cuantificación (LC)	Valor superior al LD, a partir del cual los resultados que se obtienen cumplen con condicionantes de precisión y de exactitud predeterminados por exigencias de norma, cliente, laboratorio, entre otros.
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	<p>La precisión se determina para circunstancias específicas que en la práctica pueden ser muy variables.</p> <p>Se realiza con dos medidas de precisión la repetibilidad, donde los resultados van a depender de una prueba con el mismo método, los mismos accesorio de laboratorio, en el mismo laboratorio, por el mismo analista usando el mismo equipo en intervalos de tiempo cortos; y la reproducibilidad, que se obtiene de los resultados de prueba generados con el mismo método, en un material idéntico, por diferentes analistas.</p> <p>Se calcula el porcentaje de la desviación estándar (%SDR) que debe ser $\leq 5\%$.</p>
Exactitud	<p>Se puede establecer por la comparación de los resultados obtenidos en cada ensayo, los materiales de referencia certificados (MRC), con los valores teóricos de los mismos, observando el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor esperado. Para lo cual se determina un Z score, el mismo que determina si el método es:</p> <p style="text-align: center;">Z score ≤ 2: Satisfactorio $2 > Z\text{-score} < 3$: Cuestionable Z-score ≥ 3: Insatisfactorio</p>
Incertidumbre	<p>Según Maroto (2002) la incertidumbre proporciona una idea de la calidad del resultado debido a que indica cuánto puede alejarse un resultado del valor considerado verdadero.</p> <p>Se determina con los valores de resolución de equipos (espectrofotómetro), desviaciones estándar de repetibilidad, reproducibilidad y MRC.</p>

1.4.13 Tipos de tratamientos para aguas contaminadas con fenol

1.4.13.1 Métodos Biológicos

En el ambiente las bacterias pueden eliminar rápidamente el fenol. Generalmente es eliminado en aire (1 – 2 días), agua (9 días) y suelo (2 – 5 días) de forma lenta (Busca *et al.*, 2008).

Existen varias cepas microbianas capaces de degradar fenol, pues tienen capacidad metabólica de usar este compuesto como sustrato para su crecimiento, entre ellas podemos nombrar a *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida tropicales*, *Cryptococcus elinivooi*, *Bacillus brevis*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus erythropolis*, entre otras (Hidalgo *et al.*, 2002; Arutchelvan *et al.*, 2006; Agarry & Solomon, 2008; Busca *et al.*, 2008; Cordova *et al.*, 2009).

También han sido reportadas cepas de hongos con actividad para biodegradar fenol. Actinomicetes, *Nocardia hydrocarbonoxydans*, han presentado características de eficiente degradación de fenol, ser resistentes a la contaminación y tener nivel de concentración inhibitorio más alto, en comparación con muchas especies microbianas degradadoras de fenol (Busca *et al.*, 2008).

Muchos de los cultivos analizados son capaces de degradar fenol en bajas concentraciones. Sin embargo, el fenol es tóxico para muchos tipos de microorganismos en altas concentraciones y puede ser un inhibidor para su crecimiento. Por lo tanto, para obtener mejores resultados, la concentración de fenol necesita ser mantenida bajo los límites de toxicidad y se requiere de una

aclimatación de los organismos en el ambiente de agua residual (Busca *et al.*, 2008).

Varios estudios se han llevado a cabo con cultivos puros de microorganismos, lo cual limita su campo de aplicación, debido a la presencia de diferentes contaminantes en las aguas residuales (Busca *et al.*, 2008).

La aplicación de consorcios microbianos para procesos de biorremediación es considerada pues tienen algunas ventajas con respecto a los cultivos puros (Ambujom, 2001). Se puede aumentar la tasa de degradación de fenol (Ambujom & Manilal, 1995; Cordova *et al.*, 2009) y permitir que el consorcio supere limitaciones para la completa biodegradación de este tipo de compuestos tóxicos (Ambujom, 2001).

1.4.13.1.1 Biodegradación bajo condiciones aerobias

La biodegradación bajo condiciones aerobias puede darse principalmente por dos vías metabólicas.

En la vía metabólica *meta*-rompimiento de degradación de fenol inicia con oxidación, en la que el anillo aromático es inicialmente monohidroxilado por una fenolmonoxigenasahidroxilasa en una posición *orto*, para la preexistencia del grupo hidroxilo y de esta manera formar catecol. Este es el principal intermediario que resulta del metabolismo del fenol por diferentes cepas de microorganismos (Agarry & Solomon, 2008).

Dependiendo del tipo de cepa, el catecol sufre después un fraccionamiento del anillo, el cual puede suceder en la posición *orto* o *meta*, y de esta manera iniciar la vía metabólica *orto*, que termina en la formación de succinil Co-A y acetil Co-A, o en la posición *meta* que termina en la formación de piruvato y acetaldehído, respectivamente, esto se muestra en la Figura 1.3 (Tziotziotes *et al.*, 2005; Agarry & Solomon, 2008).

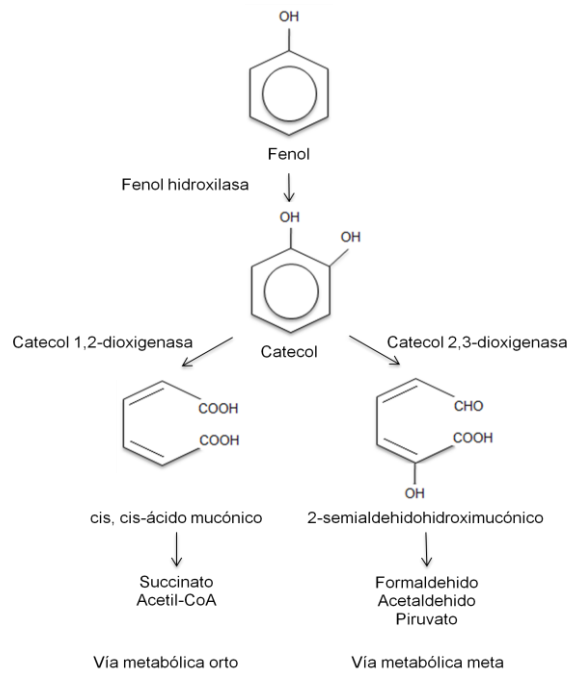


Figura 1.3 Vía metabólica para la biodegradación de fenol en condiciones aerobias (Bajaj *et al.*, 2008b).

1.4.13.1.2 Biodegradación bajo condiciones anaerobias

La eliminación de fenol se puede hacer anaeróbicamente. En muchos casos este tipo de biorremediación es la preferida, debido al ahorro de energía usada en la aireación con producción de menores cantidades de lodos (Fang *et al.*, 2006).

Para la eliminación de productos químicos orgánicos tóxicos como es el caso del fenol, se puede usar reactores en etapas o series. La primera etapa puede consistir en un reactor de tanque de agitación continua con sedimentador y reciclado y la segunda en una forma de reactor de flujo pistón sin reciclado (Figura 1.4), es decir que se puede aplicar en un inicio un biorreactor aerobio, seguido de uno en condiciones anaerobias. Este tipo de sistema de biorreactores podrían eliminar una concentración de fenol de 4000 mg.L⁻¹ hasta 0.02 mg.L⁻¹ (Rittmann & McCarty, 2001).

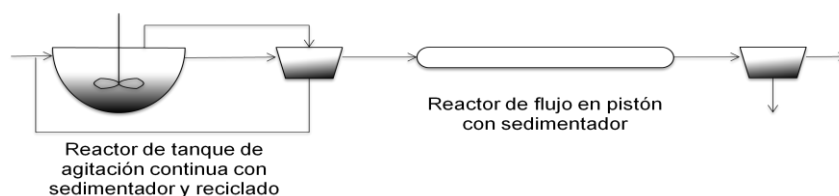


Figura 1.4 Posible sistema de reactor en dos etapas para tratamiento de altas concentraciones de fenol (Rittmann & McCarty, 2001).

Existen varias vías metabólicas de degradación de fenol bajo condiciones anaerobias, en este caso el anillo aromático no es oxidado, pero sí reducido (Rigo & Alegre, 2004). En condiciones mesófilas se han sugerido las siguientes vías, el fenol es convertido primero a través de carboxilación para producir benzoato; después, es desaromatizado para formar cicloheanocarboxilato, el cual es fraccionado para formar heptanoato y este es posteriormente degradado a través de β -oxidación para formar valerato, propionato y acetato, o directamente formar propionato y butirato, los cuales más tarde pueden ser degradados en acetato. Estas vías metabólicas se basan en la presencia de enzimas que realizan reacciones de carboxilación, descarboxilación y dehidroxilación durante la degradación anaerobia (Fang *et al.*, 2006).

En otra vía metabólica de degradación, el fenol es reducido en presencia de nitrato a ciclohexanona y después a n-caproato, el cual subsecuentemente sufrirá una β -oxidación para formar ácidos grasos volátiles, como se muestra en la Figura 1.5 (Fang *et al.*, 2006).

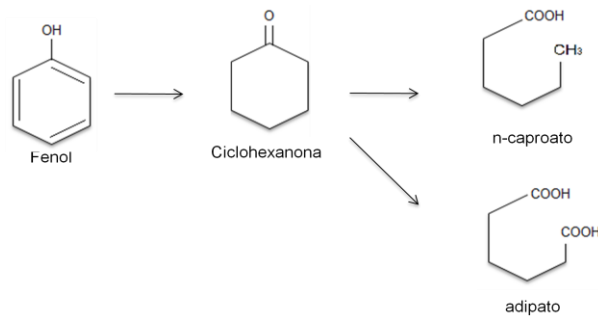


Figura 1.5 Degradación de fenol a través de la vía de la ciclohexanona (Fang *et al.*, 2006).

También, el fenol puede ser transformado a benzoato por vía de carboxilación reductiva y después a través de la vía del benzoil-CoA producir acetato e hidrógeno (Chen *et al.*, 2008).

1.4.13.1.3 Aplicación de co-substratos en sistemas de degradación de fenol

El fenol puede ser usado como única fuente de carbono y energía para los microorganismos, o en combinación con otros sustratos.

La presencia de más de un compuesto orgánico en el sistema puede afectar las funciones de biodegradación. Muchos estudios han reportado los efectos inhibitorios o aumento en los sistemas de degradación de fenol al adicionar glucosa o compuestos fenólicos (Ambujom, 2001). Al colocar un co-substrato, se puede mejorar, disminuir o no afectar en la biodegradación de contaminantes como el fenol (Bajaj *et al.*, 2008b).

Por ejemplo, Arutchelvan, Kanakasabai, Elangovan, Nagarajan, Muralikrishnan (2006), pudieron observar que al adicionar un co-substrato (dextrosa) en rangos de 0.2 – 0.8% (p/v), existe una reducción en la eficiencia de degradación de fenol. El organismo ignora el fenol en presencia de dextrosa y el periodo de degradación de fenol es retrasado.

Por otro lado, debido a las altas concentraciones de fenol que puede encontrarse en el sistema, los microorganismos pueden sufrir inhibición, afectando su crecimiento y en consecuencia la degradación de fenol (Lob & Tar, 2000).

Existen varios métodos que han sido propuestos para superar la inhibición de sustrato y poder tratar aguas residuales con altas cargas fenólicas. Entre estos métodos se incluye, adaptar los cultivos para altas concentraciones de fenol, inmovilización de cultivos y uso de microorganismos genéticamente modificados. La inmovilización puede realizarse en hidrogeles, carbón activado y membranas de fibras (Lob & Tar, 2000; Mamma *et al.*, 2004).

Otra manera de incrementar la tolerancia del cultivo ante la inhibición del sustrato es suplementar el medio de cultivo con fuentes de carbono convencionales, tales como extracto de levadura, glucosa, fructosa, glutamato de sodio, entre otros. En muchos casos el añadir un co-sustrato hasta cierta cantidad puede aumentar las tasas de degradación de fenol, debido a la producción de masa celular adicional la cual aumenta la reducción de fenol (Lob & Tar, 2000; Mamma *et al.*, 2004; Bajaj *et al.*, 2008b).

1.4.13.2 Métodos físico – químicos

La revisión realizada por Busca, Berardinelli, Resini & Arrighi (2008) muestra la mayoría de tratamientos que se pueden emplear para separar y/o destruir el fenol presente en soluciones acuosas. A continuación se resumen algunos de ellos.

1.4.13.2.1 Separación de fenol de soluciones acuosas

La destilación se basa en la volatilidad del fenol, este proceso demanda alta cantidad de energía.

Se puede emplear otros procesos como la extracción de fenol del agua con la ayuda de algunos solventes orgánicos como hidrocarburos, compuestos oxigenados, n-hexano, ciclohexanol, benceno, tolueno, entre otros. Dependiendo del proceso, el fenol puede ser removido en concentraciones de 20 – 500 mg.L⁻¹.

La adsorción es ampliamente usada en la purificación de pequeños ríos contaminados y aguas residuales. Algunos adsorbentes usados son el carbón activado o resinas poliméricas.

También se pueden emplear membranas de polipropileno y solventes orgánicos tales como metil-terbutil-éter (MTBE), cumeno y una mezcla de hidrocarburos, con una sobre presión de 31 – 38 kPa, para la extracción de fenol.

1.4.13.2.2 Destrucción de fenol en soluciones acuosas

Existen varias formas para destruir el fenol en soluciones acuosas, a continuación se sintetiza algunas de ellas.

La oxidación total de fenol por aire u oxígeno en solución acuosa se puede realizar de tres maneras:

- a) Oxidación con aire húmedo no catalítico: se basa en las propiedades oxidativas del oxígeno del aire, es aplicado en tratamiento de aguas residuales, en especial cuando son muy diluidas para incinerar y demasiado tóxicas para tratamientos biológicos. Una mineralización completa de aguas residuales es imposible con este método, debido a que algunos compuestos de bajo peso molecular son resistentes a la oxidación.

- b) Oxidación de aire húmedo catalítico (siglas en inglés CWAO): las catálisis homogéneas de CWAO son usualmente la transición catiónica de un metal (iones Cu y Fe). El carbón activado también puede actuar como catalizador aunque pueda ser consumido por la oxidación.

- c) Polimerización oxidativa con oxígeno en presencia de enzimas: la tirosina (polifenol oxidasa) y lactasa convierten los fenoles usando oxígeno en o-quinonas. Amjad & Qay (2007), estos compuestos también pueden ser fácilmente filtrados y/o adsorbidos en sólidos.

Otro tipo de oxidación puede ser la oxidación húmeda con químicos oxidantes, los cuales incluyen:

- a) Oxidación con ozono: consiste en que el ozono molecular actúa directamente en los sitios nucleofílicos y radicales insaturados de los compuestos orgánicos. Sus principales intermediarios son hidroquinona, benzoquinona y catecol, pero el principal producto es el ácido oxálico.

- b) Oxidación con peróxido de hidrógeno: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) tiene una cantidad de oxígeno efectiva, su costo es bajo, de fácil almacenamiento, manejo y sobre todo, amigable con el ambiente. Sin embargo, la reactividad del H_2O_2 es generalmente baja y en gran parte incompleta debido a su cinética.

Otra forma de empleo del H_2O_2 es en conjunto con Fenton y sal de hierro (II) para producir radicales hidroxilos, los cuales pueden oxidar compuestos orgánicos en solución. Sin embargo, el monitoreo de la reacción de Fenton hace de este un proceso costoso e inhibe su uso común, además pueden producirse intermediarios mucho más tóxicos que el propio fenol.

También existe la posibilidad de usar una polimerización oxidativa con peróxido de hidrógeno catalizado por peroxidasas; sin embargo, el costo

elevado de las enzimas limita su uso.

- c) Oxidación con otros químicos oxidantes: incluyen la oxidación con clorina y dióxido de cloro y permanganato de potasio. Estos métodos no son amigables con el ambiente debido a la formación de compuestos orgánicos clorados y a la dispersión de compuestos como el Manganeseo (Mn). Además de ser costosos, también requieren un control preciso de pH. También se puede usar el ión ferrato (VI), el cual es un oxidante fuerte amigable con el ambiente, pero su potencial redox decrece fuertemente por incremento de pH.

La oxidación electroquímica es un proceso indirecto de electro-oxidación incluyendo "electrofenton". Mohan *et al.* (2007) dice también que esta técnica puede oxidar efectivamente muchos contaminantes orgánicos e inorgánicos en concentraciones altas de cloro. Es posible la formación de compuestos intermediarios orgánicos clorinados.

El ozono también puede ser usado como electro-oxidación, con la ayuda de mediadores (iones metálicos).

Tanto la electrooxidación mediada como el electrofenton usualmente necesitan operar en medio ácido para evitar la precipitación de los hidróxidos metálicos. Este método se ve limitado por la adición de metales pesados que pueden formar contaminantes secundarios.

Por otro lado tenemos la oxidación directa anódica, la cual se basa en la electro-oxidación de contaminantes aplicada directamente en ánodos por "oxígeno activo". La adsorción física del "oxígeno activo" puede causar una completa combustión de compuestos orgánicos.

La oxidación directa no necesita añadir una alta cantidad de químicos para aguas residuales o colocar O_2 para los cátodos. No tienden a producir

contaminantes secundarios y requiere muy pocos accesorios. Lo importante de una oxidación directa (oxidación anódica) es el material del ánodo. Sin embargo, ninguno tiene suficiente actividad y al mismo tiempo estabilidad.

También se puede destruir el fenol mediante la oxidación fotocatalítica. Se han reportado conversiones de fenol significantes por luz ultravioleta (UV) sola. Sin embargo, la actividad en la oxidación de fenol sobre la irradiación UV puede ser fuertemente mejorada en la presencia de fotocatalisis.

El Óxido de Titanio (TiO_2) tiene actividad fotocatalítica y ha sido investigado para aplicar en la destrucción de contaminantes tóxicos del ambiente. Este es económico, no tóxico, resistente a la foto-corrosión y tiene un alto poder oxidativo. Por otro lado, permite la adsorción de contaminantes pero también la desorción de intermediarios y productos.

Existen otros métodos de destrucción de fenol que no son oxidativos, como por ejemplo la gasificación de fenol en agua superficial. Este método consiste en la conversión de material orgánico en productos gaseosos como el hidrógeno (H_2), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), vía reacciones en agua y con agua, a temperatura y presión que exceda el punto crítico termodinámico.

La aplicación de descargas eléctricas para degradación de fenol también es empleada. Existen varios procesos diferentes, tales como descargas electro-hidráulicas (siglas en inglés, EHD), descargas corona pulsadas (siglas en inglés, PCD) y electrólisis. Las PCD han recibido mayores investigaciones debido a que se puede inyectar directamente energía eléctrica en una solución acuosa por canales de plasma.

La sonicación y cavitación hidrodinámica son sistemas que proveen energía para destruir fenol en soluciones acuosas; sin embargo, son pobremente eficientes si son empleadas solas, sin la co-presencia de oxidantes químicos. Cuando son combinadas con otros procesos de oxidación pueden

mejorar la destrucción de fenol.

1.5 Hipótesis

La concentración de fenol en agua sintética se reduce, bajo la acción de dos consorcios bacterianos nativos, aerobio y anaerobio facultativo a nivel de laboratorio.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La Escuela Politécnica del Ejército aportó con el financiamiento y espacio físico para el desarrollo de esta investigación, dentro del proyecto CEINCI (Centro de Investigaciones Científicas ESPE) 2010 titulado: “Obtención de un inóculo bacteriano nativo compuesto capaz de degradar contaminantes típicos en efluentes de industrias textiles, para que sea utilizado como biomasa en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales a escala real”.

El laboratorio de la Subsecretaría de Electricidad y Energía Renovable, ex Comisión Ecuatoriana de Energía Atómica (CEEA) ubicado en la Escuela Politécnica del Ejército, donde se desarrollaron los ensayos de investigación.

Ing. Enrique Arévalo a cargo de los laboratorios de la CEEA e Ing. Paulina Guevara, aportaron con su conocimiento en el análisis previo de determinación de la concentración de fenol en aguas.

MSc. Alma Koch y Dra. Blanca Naranjo, directora y codirectora de tesis respectivamente, aportaron con sus conocimientos y apoyo en toda la ejecución del trabajo. El Ing. Pedro Romero asesoró el análisis estadístico de esta investigación.

2.2 Zona de Estudio

Los consorcios analizados en este trabajo fueron proporcionados por el cepario del laboratorio de microbiología de la ESPE, los mismos que fueron obtenidos y aislados por Ayala (2010) y Moncayo (2010).

Esta investigación fue realizada en los laboratorios de la CEEA, ubicados en la Escuela Politécnica del Ejército, Av. El Progreso s/n, en conjunto con el Laboratorio de Microbiología ubicado en el mismo centro universitario.

2.3 Período de tiempo de investigación

La investigación tuvo una duración de 9 meses, desde julio del 2009 hasta abril del 2010.

2.4 Diseño Experimental

Los consorcios bacterianos analizados en este trabajo fueron:

- Consorcio en condiciones aerobias – consorcio aerobio (M 3).
- Consorcio seleccionado, en condiciones aerobias (MS 3).
- Consorcio en condiciones anaerobias – consorcio anaerobio facultativo (I 5).

Los análisis estadísticos se hicieron planteando un diseño experimental de 2x2x4 para el consorcio MS 3, donde sus factores fueron fenol (10 y 100 mg.L⁻¹), glucosa (0 y 200 mg.L⁻¹) y tiempo (días en los cuales el porcentaje de degradación de fenol llegó al 100%). Tomando en cuenta las tres repeticiones de cada tratamiento (Tabla 2.1).

El tratamiento de MS 3 con 400 mg.L⁻¹ de fenol y sus combinaciones con glucosa (0 y 200 mg.L⁻¹) no se incluyeron en el análisis estadístico, puesto que sus concentraciones de fenol se mantuvieron constantes durante los días de monitoreo. De igual manera se procedió con los consorcios M 3 e I 5.

Tabla 2.1 Tratamientos del diseño experimental realizados con los tres consorcios nativos compuestos usados en la fase de experimentación de la investigación, por separado.

Consortio analizado	Tratamiento	Concentración de Fenol (mg.L ⁻¹)	Concentración de Glucosa (mg.L ⁻¹)
M 3,I 5 yMS 3.	T1	10	0
	T2	10	200
	T3	100	0
	T4	100	200
	T5	400	0
	T6	400	200

En el diseño experimental de cada consorcio se incluyó controles de cada tratamiento que se especifican en la Tabla 2.2 y tres controles fuera de ellos. El objetivo de estos controles fue el de relacionarlos con las unidades experimentales de cada tratamiento para constatar que la degradación no es causada por efectos abióticos (Margesin *et al.*, 2004; Marrot *et al.*, 2006).

Tabla 2.2 Controles añadidos al diseño experimental de cada consorcio por separado.

Consortio	Control	Cantidad de inóculo	Concentración de Fenol (mg.L ⁻¹)	Concentración de Glucosa (mg.L ⁻¹)
M 3,I 5 yMS 3.	CT1	0	10	0
	CT2	0	10	200
	CT3	0	100	0
	CT4	0	100	200
	CT5	0	400	0
	CT6	0	400	200
M 3 yMS 3.	Control 1	0	0	0
	Control 2	0	0	200
	Control 3	5%	0	0
I 5	Control 1	0	0	0
	Control 2	0	0	200
	Control 3	20%	0	0

2.5 Procedimientos

2.5.1 Determinación de la concentración de fenol en muestras de aguas residuales de industrias textiles

Se obtuvieron muestras de aguas residuales de varias industrias textiles ubicadas en la provincia de Pichincha, Ecuador; para conocer su concentración de fenol.

Los métodos de conservación, almacenamiento, limpieza y determinación de fenol en las aguas residuales de industrias textiles se siguieron de acuerdo a lo especificado por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 5530 (1998).

Para la conservación y almacenamiento, las muestras se acidificaron con 2 mL de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por litro de muestra hasta llegar a un $pH < 2$ y se dejó en refrigeración a $4^\circ C$, durante un máximo de 28 días. Dentro de ese período de tiempo se destilaron las muestras para su análisis respectivo.

El proceso de limpieza de cada muestra consistió en destilar el agua residual para eliminar impurezas no volátiles. Debido a que la volatilización de los fenoles es gradual, el volumen destilado fue igual al de la muestra original. Para la destilación se colocó 300 mL de muestra en un balón de destilación con núcleos de ebullición, se añadió tres gotas de ácido fosfórico (H_3PO_4) 10% v/v (Anexo A) y 1 mL de anaranjado de metilo (Anexo A), se esperó observar una coloración rosada. Las muestras se destilaron herméticamente y por completo.

Se realizaron varias curvas de calibración para determinar la concentración de fenol en las muestras de agua residual textil. A partir de una solución *stock* preparada con agua destilada de 500 mg.L^{-1} de fenol, se prepararon ocho soluciones estándar diluidas en agua, de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4,

0.5, 1, 2 y 3 mg.L⁻¹. Todas las curvas estándar que se emplearon tuvieron un R² mayor a 0.995.

Tanto los estándares como las muestras fueron procesadas de la misma manera. Se tomó 2.5 mL de cada muestra y se colocó 75 µL de Hidróxido de amonio (NH₄OH) 0.5 N (Anexo A), se homogenizó. Se añadió 75 µL de solución tampón de fosfato de potasio (Anexo A) y se homogenizó. A continuación, en oscuridad se adicionó 25 µL de solución de 4-aminoantipirina (Anexo A), se mezcló bien; posteriormente se añadió 25 µL de solución de Ferricianuro de Potasio (K₃Fe(CN)₆), se homogenizó. Se esperó 15 min y finalmente se tomó las lecturas de absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 500 nm.

Las absorbancias obtenidas se compararon con las absorbancias de las curvas estándar preparadas y se determinó la concentración de fenol presente.

2.5.2 Consorcios bacterianos

El consorcio bajo condiciones aerobias (M 3) se obtuvo a partir de suelo contaminado con agua residual textil, el mismo que presentó capacidad de remoción del colorante en un medio de cultivo con colorantes reactivos textiles (Ayala, 2010). A partir de este consorcio se seleccionó un consorcio condiciones aerobias, que presente capacidad de degradación de fenol (MS 3).

El consorcio bajo condiciones anaerobias (I 5) fue obtenido por exposición a los tubos de ensayo con medio de cultivo y colorantes al aire (Moncayo, 2010).

Tanto el consorcio M 3 como I 5 se almacenaron en medio de cultivo con glucosa y sin colorantes, en frascos BOECO tapa azul de 250 mL y el consorcio MS 3 se almacenó en un erlenmeyer de 250 mL con tapón de

algodón y gasa. Los tres consorcios se conservaron en refrigeración a 4°C (Prpich & Daugulis, 2005; Asses *et al.*, 2009) y antes de ser usados para su activación se los dejó a temperatura ambiente durante algunos minutos.

A los consorcios M 3 e I 5 se analizó su capacidad de remoción de colorantes reactivos y en esta investigación su capacidad de degradar fenol, además de ser usados en otros trabajos como degradación de detergentes y metales pesados (cromo, cobre y zinc).

2.5.3 Condiciones de incubación

Los tres consorcios fueron incubados a 35°C. M 3 y MS 3 se colocaron en erlenmeyers con tapones de algodón y gasa; se incubaron en agitación a 150 rpm en una incubadora WIS-20R y se inoculó el 5% de cultivo activado en cada unidad experimental (Arutchelvan *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Bajaj *et al.*, 2008b).

En el caso del consorcio I 5, se inoculó el 20% de cultivo activado en cada unidad experimental (Moosvi *et al.*, 2005) y se mantuvo estáticamente en una incubadora VWR-1515E en frascos BOECO tapa azul, bien cerrados.

2.5.4 Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo (agua sintética) usado fue tomado de Jiang *et al.* (2004) y modificado por Ayala (2010) y Moncayo (2010). En la Tabla 2.3 se muestra parte de la composición del medio mineral.

Tabla 2.3 Concentraciones de parte de los compuestos añadidos al medio de cultivo mineral tomado de Jiang *et al.* (2004), modificado por Ayala (2010) y Moncayo (2010).

Nombre del compuesto	Fórmula	Concentración (g.L ⁻¹)
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.00
Sulfato de Magnesio hidratado	MgSO ₄ .H ₂ O	0.20
Cloruro de Sodio	NaCl	0.10
Sulfato de Calcio	CaSO ₄	0.06
Fosfato mono ácido de Potasio	K ₂ HPO ₄	1.00
Fosfato di ácido de Potasio	KH ₂ PO ₄	2.00

Además se añadió, EDTA sódico, 0.0174g y Sulfato de hierro (FeSO₄), 0.013g preparados en 900 mL de agua.

En el caso de los consorcios M 3 e I 5, se colocó una solución tampón de fosfato con la siguiente composición: Fosfato diácido de sodio (NaH₂PO₄), 46.24 g.L⁻¹ y Fosfato ácido de sodio (Na₂HPO₄), 56.84 g.L⁻¹ (Moncayo, 2010). El pH del medio de cultivo fue de 6.8.

Este medio de cultivo fue esterilizado por calor a 121°C, durante 20 min (Mamma *et al.*, 2004), en un autoclave Tuttnauer-3870ML. Todos los componentes fueron esterilizados por separado y cuando se encontraron a temperatura ambiente se mezclaron asépticamente, con el fin de que no precipiten los reactivos; se completó el medio de cultivo con agua fría estéril (Ayala, 2010; Moncayo, 2010).

El fenol añadido al medio de cultivo se esterilizó por filtración (filtros milipore 0.45 µm) y se añadió de forma aséptica (Kumaran & Paruchuri, 1997; Rigo & Alegre, 2004; Suárez *et al.*, 2007). Para llegar a las diferentes concentraciones empleadas en los medios de cultivo se partió de una solución madre de fenol de 5000 mg.L⁻¹ y se realizaron las diluciones apropiadas.

2.5.5 Determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo

La concentración de fenol residual que se presentaba en el medio de cultivo se determinó a través del método fotométrico directo, donde el fenol forma un complejo colorimétrico con 4-aminoantipirina y ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$) a condiciones óptimas de pH y las lecturas de absorbancia son tomadas a una longitud de onda de 500 nm. Este método fue tomado y modificado del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998, p. 5-40.

Después de medir la $D.O._{600nm}$, los microtubos con cultivo restante se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga SIGMA 1-14, con el fin de separar la biomasa del medio de cultivo, este procedimiento fue tomado y modificado de Jianget *al.* (2007).

El sobrenadante libre de biomasa se diluyó en 5 mL con agua destilada, dependiendo de la concentración, se diluyó entre 10 y 100 veces. Las diluciones se colocaron en tubos plásticos falcon y se procesaron inmediatamente.

En cada tubo falcon se distribuyó de 100 a 230 μ L de Hidróxido de Amonio (NH_4OH) 0,5 N (Anexo A) y se homogenizó; a continuación, se colocó de 10 a 260 μ L de solución tampón de fosfato (Anexo A) y se homogenizó; se midió su pH usando el pHmetro HANNA instruments HI 221 hasta alcanzar un pH de 7.9 ± 0.1 . Las cantidades de hidróxido de amonio (NH_4OH) y solución tampón de fosfato colocadas dependieron de la dilución realizada.

Posteriormente, bajo obscuridad se colocó 50 μ L de 4-aminoantipirina (Anexo A), se homogenizó; después, se adicionó 50 μ L de solución de ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), se homogenizó. Todos los homogenizados se realizaron en un vortex Genie k-550-G.

Se dejó incubar las muestras a temperatura ambiente durante 15 min y finalmente, se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro Genesys 10-S a una longitud de onda máxima de 500nm.

Se reportaron las absorbancias medidas y se calculó el contenido de fenol en cada muestra usando la curva promedio de calibración especificada en la validación del método para determinación de la concentración de fenol, tomando en cuenta las respectivas diluciones realizadas.

2.5.6 Validación del método para determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo

El método empleado para la determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo fue tomado y modificado del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 5530 D, (1998).

La validación del método analítico se determinó cumpliendo los parámetros y objetivos que se describen en el cuadro 2.1.

Para el cumplimiento de los objetivos y la validación del método de determinación de concentración de fenol en medio de cultivo, se realizaron diez curvas estándar, escogiendo siete con un R^2 mayor a 0.995, para realizar una curva promedio de calibración y con esta calcular la concentración de fenol en cada ensayo.

Se preparó una solución madre de fenol de 500 mg.L^{-1} en medio de cultivo descrito anteriormente en 2.5.4 (sin solución tampón ni glucosa) y a partir de esta solución se diluyó en agua destilada las soluciones estándares de fenol de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3 y 5 mg.L^{-1} que posteriormente fueron analizadas.

Cuadro 2.1 Parámetros y objetivos para validar el método de determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo (ASECAL, 2005).

Parámetro	Objetivo
Linealidad / Función de respuesta	El R^2 obtenido de la regresión lineal deberá ser > 0.995 para cada curva de calibración, elegir las curvas realizadas durante el proceso de validación con el mejor coeficiente de variación y realizar una curva promedio para los análisis. Para autenticación de la linealidad también tomar en cuenta la pendiente y la intersección con el eje.
Límite de detección	Obtener un LD $< 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, aplicando $LD = 3 \times S$ de las lecturas de un blanco libre de fenol, donde S es la desviación estándar de la muestra.
Límite de cuantificación	Obtener un LC $< 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, aplicando $LC = 10 \times S$ de las lecturas de un blanco libre de fenol, donde S es la desviación estándar de la muestra.
Precisión (repetibilidad y/o reproducibilidad)	<p>Calcular el %SDR para los niveles bajo, medio y alto de fenol de las 10 repeticiones realizadas, tanto para los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad.</p> <p>Nivel bajo: 10 mg.L^{-1} } Nivel medio: 100 mg.L^{-1} } $\%SDR \leq 5\%$ Nivel alto: 400 mg.L^{-1} }</p>
Exactitud	Realizar varias mediciones de un material de referencia certificado (MRC) y evaluar el valor medio, calculando el Zscore que debe ser ≤ 2 .
Incertidumbre	<p>Realizar la estimación de la incertidumbre y obtener valores con $k = 2$.</p> <p>Nivel bajo: 10 mg.L^{-1} } Nivel medio: 100 mg.L^{-1} } $\% \text{ Error} < 30$ Nivel alto: 400 mg.L^{-1} }</p>

Los valores utilizados para la validación se escogieron de todos los ensayos realizados periódicamente. Se tomaron blancos, es decir muestras de agua destilada libre de fenol y los controles de cada tratamiento que contenían fenol con las concentraciones de cada tratamiento ($10, 100$ y 400 mg.L^{-1}) y sin carga bacteriana.

2.5.7 Determinación de la biomasa en el medio de cultivo

La concentración inicial de biomasa usada para cada unidad experimental se determinó con el método de siembra profunda (Benson's, 2007) y su crecimiento se monitoreó mediante espectrofotometría (Saravanan *et al.*, 2008b).

2.5.7.1 Método de siembra profunda

Este método se tomó y modificó del manual de laboratorio de microbiología general de Benson's (2007), el que se usó para conocer la concentración inicial de inóculo que se colocó en cada unidad experimental.

De cada inóculo se realizaron diluciones como muestra la Figura 2.1, en tubos tapa rosca con 9.9 mL de solución de cloruro de sodio (NaCl) 1.5 N estériles. Se agitó cada tubo envortex VM-300 durante 10 s; se tomó 1 mL o 0.1 mL de inóculo, dependiendo de la dilución y, se colocó en 25 mL de medio de cultivo PCA (plate count agar) estéril que se encontraba aproximadamente entre 45 – 50°C.

Una vez colocada asépticamente la cantidad de inóculo con cloruro de sodio, se agitó en forma circular durante 25 veces, evitando la formación de burbujas en el agar.

Se vertió el homogenizado asépticamente en una caja petri estéril y se dejó a temperatura ambiente hasta que el agar se solidifique. Se selló la caja con parafilm y se incubó las cajas invertidas a 35°C durante 24 – 48 h.

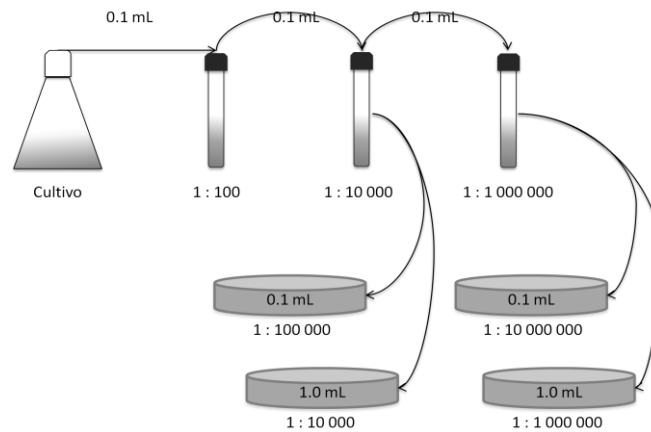


Figura 2.1 Esquema de diluciones y procedimiento del método de siembra profunda, tomado y modificado del Manual de Laboratorio de Microbiología General de Benson's (2007).

Una vez finalizado el período de incubación, se realizó un conteo en las cajas que presentaron colonias separadas y aisladas, los datos que se reportaron fueron aquellos donde su número de colonias se encontró entre 30 y 300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

2.5.7.2 Método espectrofotométrico

Este método se usó para monitorear periódicamente el crecimiento bacteriano por absorbancia (densidad óptica, D.O.) a una longitud de onda de 600 nm. El método fue tomado y modificado del Manual de Laboratorio de Microbiología General de Benson's (2007) y, su longitud de onda se escogió en relación a estudios realizados con consorcios microbianos y cultivos puros (Ambujom & Manilal, 1995; Mamma *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007; Saravanan *et al.*, 2008b).

Periódicamente, dependiendo del consorcio analizado, se tomó de cada unidad experimental asépticamente 2000 μ L de cultivo en microtubos.

Antes de cada lectura, se calibró el espectrofotómetro Genesys 10UV de acuerdo a las especificaciones del equipo y se lo enceró con agua destilada. Se usó una cubeta de cuarzo, la misma que se lavó y secó, evitando que queden pelusas y grasadentro y fuera de la misma.

Cada microtubo se agitó en un vortex Genie k-550-G para que se homogenice, e inmediatamente se tomó 1200 μL de cultivo y se colocó en la cubeta de cuarzo. Se verificó que no existan burbujas dentro de la cubeta y se la colocó en el espectrofotómetro. Finalmente, se tomó lecturas de absorbancias a 600 nm de longitud de onda. Para la lectura de la siguiente muestra se lavó la cubeta con agua destilada y se prosiguió con el mismo procedimiento.

En cada microtubo quedó aproximadamente 800 μL con cultivo, los cuales se destinaron para la determinación de concentración de fenol.

2.5.8 Selección de inóculo con capacidad de degradación de fenol (MS 3)

Se realizó un ensayo preliminar con los dos consorcios, M 3 e I 5. El medio de cultivo empleado fue el descrito en el numeral 2.5.4, sin la adición de solución tampón de fosfato. Como única fuente de carbono y energía se colocó 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol, esta concentración se escogió en base a la aclimatación bacteriana realizada por Lob & Tar (2000).

El ensayo preliminar se realizó en frascos de 250 mL (Hidalgo *et al.*, 2002; Bajaj *et al.*, 2009; Córdova *et al.*, 2009) conteniendo 140 mL de medio de cultivo y 5% de inóculo (Jiang *et al.*, 2007; Bajaj *et al.*, 2008b). Se realizaron tres repeticiones para cada consorcio y dos controles, uno con medio de cultivo y 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fenol y, otro con inóculo pero sin ninguna concentración de fenol. Se incubaron las muestras a 35°C durante un período de 21 días.

El experimento realizado con el consorcio M 3 se hizo en erlenmeyers de 250 mL con tapones de algodón y gasa, se agitó constantemente a 150 rpm (Bastos *et al.*, 2000; Arutchelvan *et al.*, 2006; Saravanan *et al.*, 2008b; Song *et al.*, 2009) en una incubadora WIS-20R.

Los frascos donde se encontraba el consorcio I 5 se incubó de manera estática, en frascos BOECO tapa azul de 250 mL. La incubadora usada fue una VWR-1515E.

La concentración inicial de biomasa inoculada fue determinada por el método de siembra profunda. Por otra parte, se tomó muestra para monitorear periódicamente el crecimiento bacteriano mediante absorbancia, usando un espectrofotómetro Genesys 10-S a una longitud de onda de 600 nm (Ambujom & Manilal, 1995; Mamma *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007; Saravanan *et al.*, 2008b).

Se midió la concentración de fenol presente en cada frasco, mediante el método directo con 4-aminoantipirina y ferricianuro de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), especificado y modificado del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1998), método que también fue aplicado por varios autores como Ambujom (2001), Alves de Lima *et al.* (2007), Moussavi *et al.* (2009), entre otros.

El inóculo seleccionado fue aquel frasco que presentó disminución total de concentración de fenol. Este inóculo se almacenó bajo refrigeración a 4°C (Prpich & Daugulis, 2005; Asses *et al.*, 2009).

2.5.9 Activación de los inóculos bacterianos

2.5.9.1 Activación de los consorcios M 3 e I 5

Los consorcios M 3 e I 5 se mantuvieron almacenados en frascos BOECO de 250 mL, bajo refrigeración a 4°C (Prpich & Daugulis, 2005; Asses *et al.*, 2009) y, antes de ser colocados en medio de cultivo fresco se los dejó a temperatura ambiente durante algunos minutos.

El medio de cultivo usado fue el descrito en 2.5.4, se añadió solución tampón de fosfato también descrita en el mismo numeral y se colocó como fuente de carbono, glucosa en una concentración de 5 mg.L⁻¹ (Mamma *et al.*, 2004).

La activación del consorcio M 3 se realizó bajo condiciones aerobias, en un erlenmeyer de 250 mL con el 6% (v/v) de inóculo (Arutchelvan *et al.*, 2006). Se incubó a 35°C, a 45 rpm, durante 36 h, para que el inóculo se encuentre en la fase exponencial y realizar el diseño experimental. Estas condiciones fueron preseleccionadas de Ayala (2010) que fue al que se encontraba acostumbrado el inóculo.

Para la activación del consorcio I 5 se usó una cantidad del 20% (v/v) de inóculo (Moosvi *et al.*, 2005). Se incubó estáticamente a 35°C, durante 60 h, para que el inóculo se encuentre en la fase exponencial y realizar el diseño experimental (Moncayo, 2010).

2.5.9.2 Activación consorcio seleccionado MS 3 bajo condiciones aerobias

El inóculo MS 3 almacenado en refrigeración a 4°C (Prpich & Daugulis, 2005; Asses *et al.*, 2009) se lo mantuvo a temperatura ambiente por algunos minutos antes de ser usado para su activación.

Inicialmente, se colocó 5% de inóculo MS 3 en medio de cultivo recién preparado (descrito en 2.5.4, sin solución tampón de fosfato), donde su única fuente de carbono y energía fueron 200 mg.L⁻¹ de fenol (Lob & Tar, 2000). Se preparó 140 mL de cultivo que fue incubado a 35°C, 150 rpm durante 35 días.

Una vez que se apreció una fase exponencial de crecimiento y una reducción de la concentración de fenol, se aumentó la cantidad de biomasa microbiana para realizar el diseño experimental.

Se preparó medio de cultivo excluyendo solución tampón de fosfato y adicionando como fuente de carbono glucosa en una concentración de 5 g.L⁻¹ (Mamma *et al.*, 2004).

En un erlenmeyer de 500 mL con un tapón de algodón y gasa, se colocó el 20% de inóculo (Moosvi *et al.*, 2005) en 203 mL de medio de cultivo. La incubación se realizó en un período de 5 días, a 35°C con agitación constante de 150 rpm.

Una vez alcanzada la fase exponencial tardía se cosechó la biomasa y, antes de ser colocada en cada unidad experimental, se realizó un lavado para eliminar el exceso de glucosa del medio de cultivo (Lob & Tar, 2000; Liu *et al.*, 2007).

Se modificó el método especificado por Muñoz *et al.* (2001), donde la biomasa obtenida se centrifugó a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 15 min en tubos falcon estériles de 50 mL, la centrifuga refrigerada usada fue una Eppendorf-5810R.

Después de centrifugar se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado asépticamente en medio de cultivo estéril sin los componentes glucosa, solución tampón de fosfato y fenol. Este lavado se lo realizó por dos veces. Finalmente, se colectó asépticamente en un erlenmeyer estéril la última

resuspensión, se midió su densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm, y partir de este inóculo unificado se montó el diseño experimental (Muñoz *et al.*, 2001).

2.6 Análisis de resultados

El análisis estadístico de resultados del consorcio MS 3 se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 16.0 para Macintosh. Los datos se analizaron mediante el modelo general lineal univariante y comparación de medias ANOVA de un factor. Además se realizaron gráficos descriptivos en el mismo paquete.

La validación del método para determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo fue analizado en EXCEL 2008 para Macintosh, donde, según los parámetros, se realizó análisis simple de varianza (ANOVA), desviaciones estándar, medias y porcentajes.

También, se realizaron gráficos descriptivos de los tres consorcio realizados en EXCEL 2008 para Macintosh.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Determinación de la concentración de fenol en muestras de aguas residuales de industrias textiles

Para las lecturas de cada muestra se preparó una curva de calibración, con la que se determinó la concentración de fenol en la muestra. El Anexo B muestra las ecuaciones de las curvas y sus R^2 que se emplearon en el análisis y, la Tabla 3.1 resume la concentración de fenol que se determinó en las muestra de agua residual de diferentes industrias textiles.

Tabla 3.1 Concentraciones de fenol (mg.L^{-1}) de muestras de aguas residuales de diferentes industrias textiles en la provincia de Pichincha, Ecuador.

Muestra textil	Fenol (mg.L^{-1})
T1	0.029
T2	0.029
T3	0.043
T4	0.106
P1	0.312
P2	0.935
P3	0.543
S1	0.181
S2	0.638
S3	0.167
E1	0.635
E2	0.556
E3	0.365
E4	0.622
E5	0.353
E6	0.628

3.2 Validación del método para determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo

Se realizaron diez curvas estándar, de las cuales, después de seleccionar las siete mejores (Anexo C), se obtuvo una curva promedio de calibración para realizar los cálculos de concentración de fenol en todas las unidades experimentales con los tres consorcios (M 3, I 5 y MS 3) y la validación del método para determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo. El R^2 de la curva promedio fue de 0.999 (Figura 3.2).

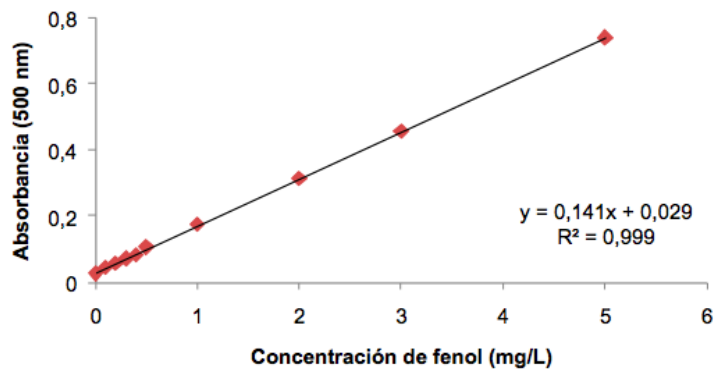


Figura 3.2 Curva promedio de calibración para la determinación de concentraciones de fenol de cada unidad experimental de los tres consorcios (M 3, I 5 y MS 3).

Para la validación del método analítico se consideró también los blancos (agua destilada libre de fenol), y los controles de cada tratamiento con ausencia y presencia de las tres concentraciones de fenol.

En la Tabla 3.2 se resumen los resultados obtenidos de cada parámetro y objetivos que se plantearon para poder validar el método analítico. La tabla determina que el método cumple con los objetivos y es validado.

Tabla 3.2 Resultados e interpretación de cada parámetro para la validación del método analítico en la determinación de fenol en medio de cultivo.

Parámetro	Valor	Interpretación
Linealidad / Función de respuesta	R^2 : 0.999 m^* : 0.141 b : 0.029	El coeficiente de correlación (R^2) es mayor a 0,995; por lo tanto hay linealidad.
Límite de detección	0.011 mg.L ⁻¹	El valor del límite de detección es menor al primer punto cuantificable de la curva de calibración (0,1 mg.L ⁻¹); por lo tanto cumple con el objetivo de validación.
Límite de cuantificación	0.035 mg.L ⁻¹	El valor del límite de cuantificación es menor al primer punto cuantificable de la curva de calibración (0,1 mg.L ⁻¹); por lo tanto cumple con el objetivo de validación.
Precisión (repetibilidad)	Nivel bajo (10 mg.L ⁻¹): 4.46% Nivel medio (100 mg.L ⁻¹): 1.10% Nivel alto (400 mg.L ⁻¹):4.44%	Los % SDr para los tres niveles de estudio son menores al 5%, lo que indica que cumple con la repetibilidad del método.
Precisión (reproducibilidad)	Nivel bajo (10 mg.L ⁻¹): 3.13% Nivel medio (100 mg.L ⁻¹):1.51% Nivel alto (400 mg.L ⁻¹):3,64%	Los % SDR para los tres niveles de estudio son menores al 5%, lo que indica que cumple con la reproducibilidad del método.
Exactitud	1.081	El valor de Z score para el material certificado es <2, por lo tanto el método tiene una exactitud satisfactoria.
Incertidumbre	Nivel bajo (10 mg.L ⁻¹): 13% Nivel medio (100 mg.L ⁻¹):3.63% Nivel alto (400 mg.L ⁻¹):12.12%	Los porcentajes de Error son menores al 30%, por lo tanto la incertidumbre del método cumple con el objetivo de validación.

* m y b : pendiente e intersección con el eje de la curva de calibración, respectivamente.

3.3 Diseño experimental con el consorcio M 3 en condiciones aerobias

La concentración inicial de M 3 se encontró en el orden de 10^5 UFC.mL⁻¹. Al colocar el 5% de inóculo activado en cada unidad experimental de 140 mL, se obtuvo un orden de 10^4 UFC.mL⁻¹. Las unidades experimentales se incubaron durante 27 días. Se monitoreó la biomasa y concentración de fenol cada día. El pH del medio de cultivo permaneció constante en 6.

Los resultados obtenidos están resumidos en la Figura 3.3 donde se puede observar que la biomasa se mantiene relativamente constante en todos los tratamientos (Figura 3.3, A), sucede lo mismo con la concentración de fenol (Figura 3.3, B). Al realizar una siembra profunda el día 21 se pudo observar en las cajas un crecimiento de 10^4 UFC.mL⁻¹, mostrando que el consorcio estaba vivo.

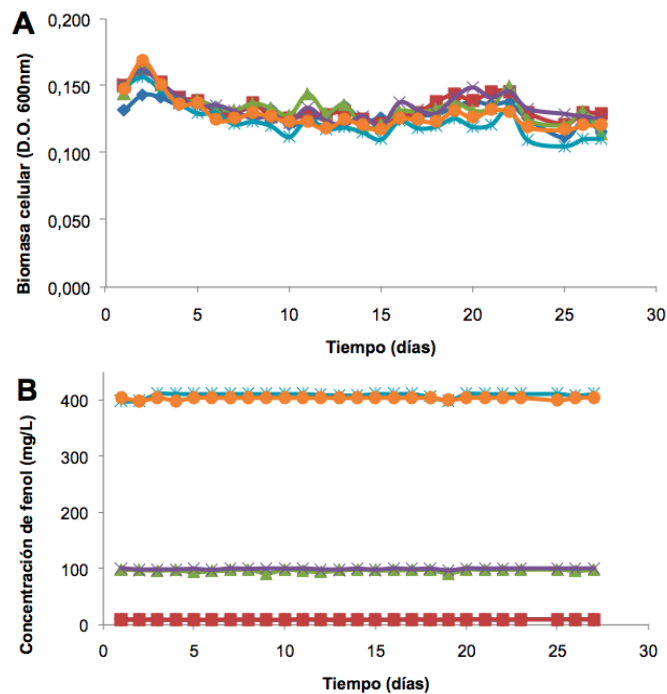


Figura 3.3 Consorcio bacteriano M 3 bajo condiciones aerobias. (A) Biomasa celular, (B) Concentración de fenol (mg.L⁻¹). (◆) 10 mg.L⁻¹ Fenol; (■) 10 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; (▲) 100 mg.L⁻¹ Fenol; (□) 100 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; (×) 400 mg.L⁻¹ Fenol; (●) 400 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa.

3.4 Diseño experimental con el consorcio 5 en condiciones anaerobias

La concentración de inóculo madre se encontró en un orden de 10^4 UFC.mL⁻¹. Al colocar el 20% de inóculo madre en 140 mL de cada unidad experimental, se obtuvo un orden de 10^3 UFC.mL⁻¹.

El período de incubación de este consorcio fue de 45 días. Se monitorearon la biomasa y concentración de fenol cada 3 días (Figura 3.4). El pH se mantuvo en 6 durante todo el experimento. Se observó un aumento en la biomasa; sin embargo, con el tiempo, disminuyó y se mantuvo constante (Figura 3.4, A). Al realizar una siembra profunda el día 18, se pudo ver un crecimiento mayor a 10^3 UFC.mL⁻¹, demostrando que el consorcio se mantenía con vida. Por otra parte la concentración de fenol permaneció constante durante toda la experimentación (Figura 3.4, B).

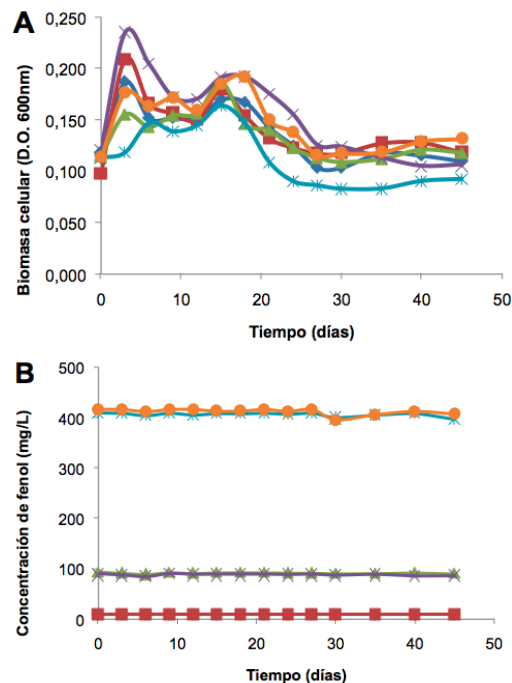


Figura 3.4 Consorcio 5 bajo condiciones anaerobias. (A) Biomasa celular, (B) Concentración de fenol (mg.L⁻¹). (◆) 10 mg.L⁻¹ Fenol; (■) 10 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; (▲) 100 mg.L⁻¹ Fenol; (□) 100 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; (×) 400 mg.L⁻¹ Fenol; (●) 400 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa.

3.5 Selección de inóculo con capacidad de degradación de fenol (MS 3)

Para la selección del inóculo con capacidad de degradación de fenol se trabajó con 200 mg.L^{-1} de fenol como única fuente de carbono y energía. La concentración inicial de inóculo fue del 5 % en 140 mL de cada unidad experimental que reflejó un orden de 10^3 UFC.mL^{-1} para ambos consorcios (M 3 e I 5).

En el ensayo realizado con el consorcio M 3, se observó que el frasco 2 presentó degradación total de la concentración de fenol (Figura 3.6, A); por lo que éste sería el inóculo seleccionado para degradar fenol, se lo almacenó en refrigeración a 4°C , para su uso en el diseño experimental y se lo etiquetó como MS 3.

La Figura 3.5 muestra la relación entre biomasa celular y la concentración de fenol del frasco 2, durante el cultivo de M 3. Se puede observar que la biomasa se incrementó con el tiempo de incubación, alcanzando una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0.400 a los 20 días. El inicio de la degradación de fenol fue a los 7 días de incubación. La concentración de fenol decrece con el incremento de $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$, llegando a su valor mínimo de 0 mg.L^{-1} en 20 días.

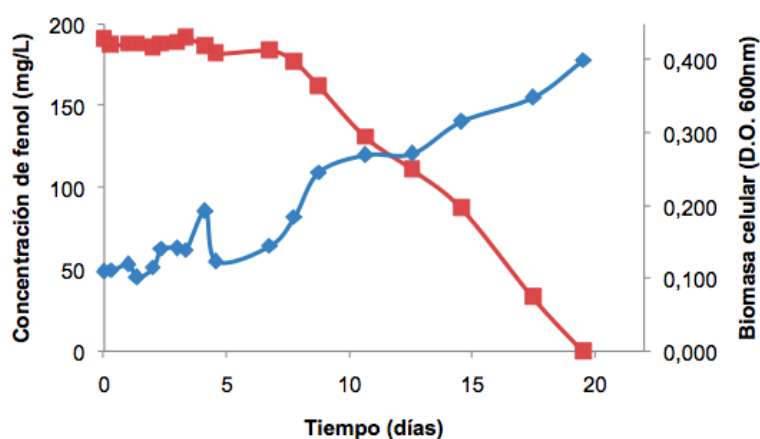


Figura 3.5 Concentración de fenol (■) y biomasa celular (◆) durante la degradación de fenol, del frasco 2, usando el consorcio M 3 bajo condiciones aerobias.

Los frascos 1 y 3 del consorcio M 3 presentaron una concentración constante de fenol (Figura 3.6, A), por lo tanto no existe degradación del mismo. Se puede mencionar la misma analogía para las tres repeticiones del ensayo realizado con I 5 (Figura 3.6, B).

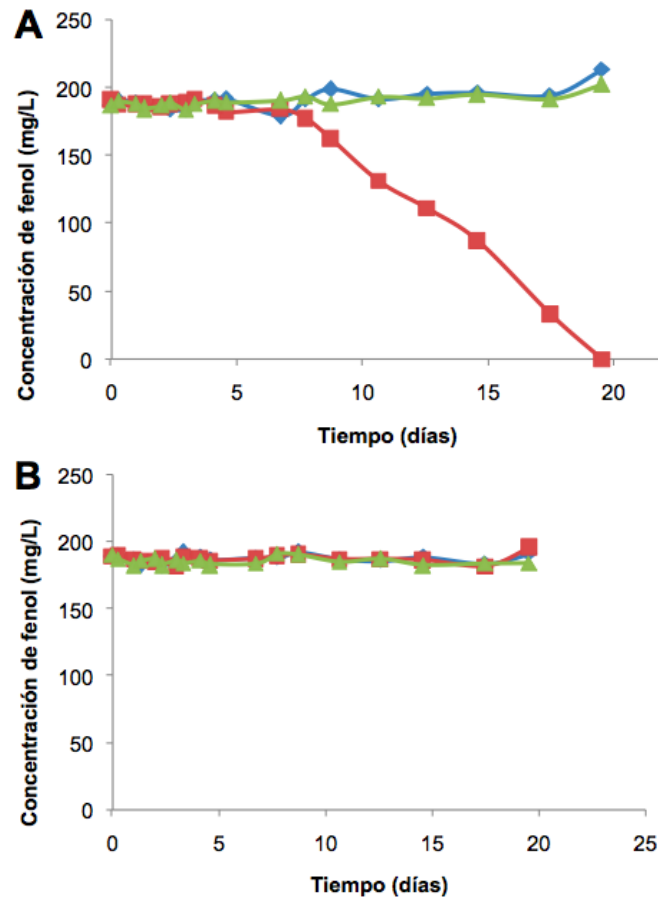


Figura 3.6 Medición de concentraciones de fenol (mg.L^{-1}) durante 20 días de incubación, con una concentración inicial de fenol de 200 mg.L^{-1} y 5 % de inóculo. (A) Inóculo M 3, (B) Inóculo I 5.

Frasco 1 (\blacklozenge), Frasco 2 (\blacksquare) y Frasco 3 (\blacktriangle).

3.6 Activación del consorcio seleccionado MS 3 en condiciones aerobias

Después de aproximadamente un mes de almacenamiento en refrigeración, el consorcio MS 3 se colocó en medio de cultivo nuevo, con 200 mg.L^{-1} de fenol como única fuente de carbono y energía.

La Figura 3.7 muestra la biomasa celular y la concentración de fenol durante el cultivo de MS 3. Se puede observar que aproximadamente a los 21 días de incubación, la concentración de fenol empieza a disminuir y la biomasa se incrementa con el tiempo. Al apreciar una fase del crecimiento y disminución periódica de la concentración de fenol, se colocó este cultivo en un medio nuevo libre de fenol, con 5 g.L^{-1} de glucosa para aumentar la cantidad de biomasa y desarrollar el diseño experimental, se realizó a los 35 días de incubación.

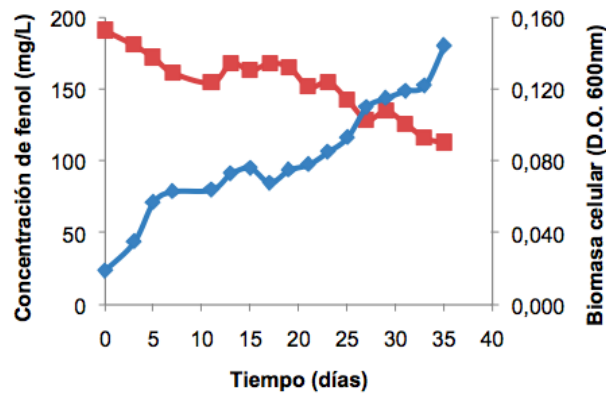


Figura 3.7 Concentración de fenol (■) y biomasa celular (◆) durante la degradación de 200 mg.L^{-1} de fenol, del consorcio MS 3 bajo condiciones aerobias, durante 35 días de incubación.

Se logró aumentar la biomasa en medio de cultivo con 5 g.L^{-1} de glucosa, desde 0,075 de D.O._{600nm} hasta 0,684 de D.O._{600nm} en un período de 5 días (Figura 3.8).

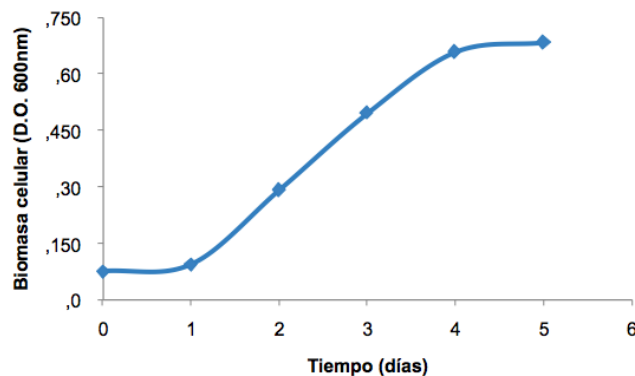


Figura 3.8 Crecimiento del consorcio MS 3 en medio de cultivo libre de fenol con 5 g.mL^{-1} de glucosa, durante 5 días de incubación.

Alcanzada la fase exponencial tardía, donde se obtuvo mayor cantidad de biomasa, se realizó un lavado para eliminar el exceso de glucosa en el medio de cultivo. Después de los lavados realizados con medio de cultivo libre de fenol, glucosa y solución tampón, se midió una D.O._{600nm} de 0.545, que tuvo un orden de 10^4 UFC.mL⁻¹, con este inóculo se montó el diseño experimental.

3.7 Diseño experimental con el consorcio MS 3 en condiciones aerobias

El diseño experimental realizado con el consorcio MS 3, al igual que con M 3 e I 5 constó de seis tratamientos (Tabla 2.1): T1, 10 mg.L⁻¹ Fenol; T2, 10 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; T3, 100 mg.L⁻¹ Fenol; T4, 100 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; T5, 400 mg.L⁻¹ Fenol; T6, 400 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa.

La concentración de biomasa con la que se inició el diseño experimental fue de 10^4 UFC.mL⁻¹ y en cada unidad se colocó un orden de 10^3 UFC.mL⁻¹. El tiempo de incubación dependió de cada tratamiento, debido a que los datos se reportaron hasta el momento que presentaron disminución completa de la concentración de fenol. En el caso de T5 y T6 se reportaron datos hasta la finalización de T3.

Para observar las diferencias de crecimiento bacteriano, tiempos de degradación y disminución o no de la concentración de fenol, se analizó inicialmente cada tratamiento por separado y se observó que los tratamientos T1, T2, T3 y T4, disminuyeron totalmente la concentración de fenol llegando a una concentración de 0 mg.L⁻¹. Los tratamientos T5 y T6 mantuvieron constante la concentración de fenol; sin embargo, se reporta aumento en su biomasa (Figura 3.9) con un pH constante de 6.

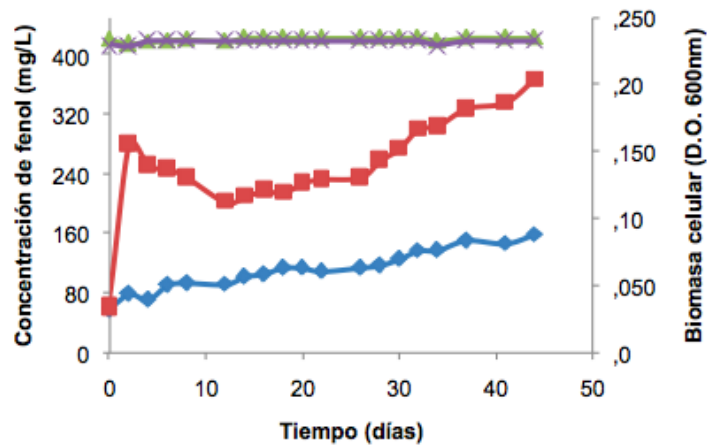


Figura 3.9 Concentración de fenol (\blacktriangle) y biomasa celular (\blacklozenge) del tratamiento T5 (400 mg.L^{-1} Fenol) y, concentración de fenol (\blacksquare) y biomasa celular (\blacksquare) del tratamiento T6 (400 mg.L^{-1} Fenol + 200 mg.L^{-1} Glucosa).

La Figura 3.10 muestra un agrupamiento de los cuatro tratamientos que lograron la degradación completa de fenol.

Se observó una fase de retardo de 8, 4, 6 y 8 días para T1, T2, T3 y T4, respectivamente (Figura 3.10, B). Superada esta fase se presenciaron disminución de la concentración de fenol.

Todos los tratamientos presentaron aumento de biomasa, tanto para aquellos donde el fenol fue su única fuente de carbono como para los que tenían como fuente alterna la glucosa (Figura 3.10, A).

Los tratamientos con diferentes concentraciones de fenol y 200 mg.L^{-1} de glucosa (T3 y T4) inicialmente presentaron un acelerado incremento de biomasa con un posterior decaimiento (Figura 3.10, A). Sin embargo, con el tiempo se observó un incremento de biomasa y esto, está relacionado con la disminución de la concentración de fenol.

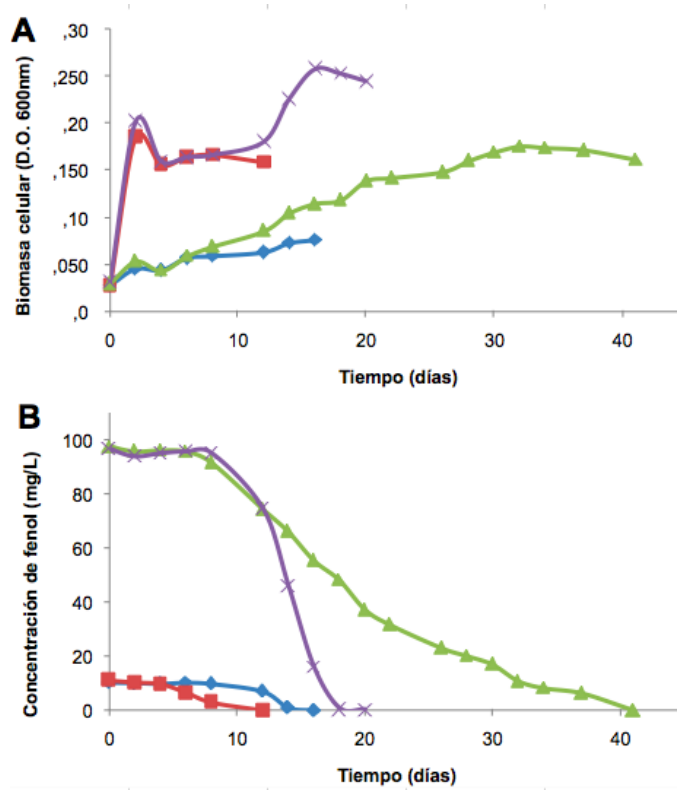


Figura 3.10 Tratamientos que presentaron completa degradación de fenol. (A) Aumento de la biomasa, (B) Disminución de la concentración de fenol. (◆) 10 mg.L⁻¹ Fenol; (■) 10 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; (▲) 100 mg.L⁻¹ Fenol; (×) 100 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa.

La tasa de degradación de fenol se calculó en base a la pendiente del período de disminución de la concentración de fenol, la Tabla 3.3 presenta los resultados obtenidos.

Tabla 3.3 Tasas de degradación de fenol de los tratamientos que presentaron disminución completa de la concentración de fenol con el consorcio MS 3.

Tratamiento	Concentración de Fenol (mg.L ⁻¹)	Concentración de Glucosa (mg.L ⁻¹)	Tasa de degradación de Fenol (mg de fenol consumido .d ⁻¹ .L ⁻¹)
T1	10	0	1.2989
T2	10	200	1.1996
T3	100	0	2.7372
T4	100	200	9.0069

Se observó también que cuando el crecimiento bacteriano es mayor, la tasa de degradación de fenol aumenta y, que al llegar a la máxima degradación (0 mg.L^{-1}) la biomasa disminuye, o en el caso de T1 se mantiene constante (Figura 3.10).

A pesar de que los primeros cuatro tratamientos degradaron completamente el fenol, el tiempo de degradación varía. Los tratamientos con glucosa se demoraron menos tiempo en degradar fenol que aquellos en ausencia de la misma; así también, el de menor concentración de fenol se demoró menos tiempo en degradar en relación al tratamiento con una concentración más alta (Figura 3.10 y Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Tiempo (días) cuando cada tratamiento llega al 100% de degradación de fenol con el consorcio MS 3.

Tratamiento	Concentración de Fenol (mg.L^{-1})	Concentración de Glucosa (mg.L^{-1})	Tiempo degradación completa de Fenol (días)
T1	10	0	16
T2	10	200	12
T3	100	0	41
T4	100	200	20

Al día 12 de incubación, el T2 presentó 100% de degradación de fenol, mientras que T1 el 33.25%, T3 el 23.80% y T4 el 22.77%. A medida que el tiempo avanza, la degradación del resto de tratamientos se va completando (Figura 3.11).

La adición de glucosa en el sistema muestra un incremento en la degradación de fenol. El añadir glucosa representa un incremento del 66.75% en la degradación de fenol en el tratamiento T2, al día 12, con relación a T1; mientras que, existe un incremento de degradación del 38.10% en T4 con relación a T3, en el día 20.

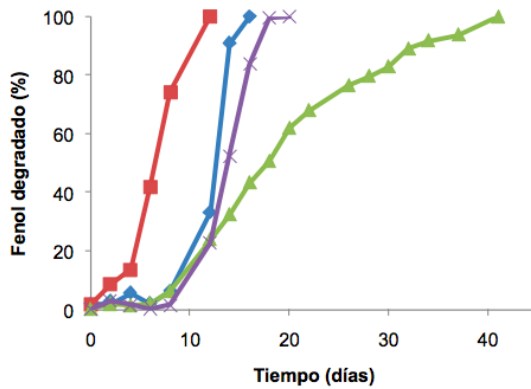


Figura 3.11 Porcentaje de degradación de fenol con los cuatro tratamientos que presentaron completa disminución en concentración de fenol. (◆) 10 mg.L⁻¹ Fenol; (■) 10 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa; (▲) 100 mg.L⁻¹ Fenol; (×) 100 mg.L⁻¹ Fenol + 200 mg.L⁻¹ Glucosa.

En el análisis estadístico se consideraron únicamente los tratamientos donde existió completa degradación de fenol para que los resultados sean más representativos.

Al interrelacionar de manera global los factores glucosa, fenol y tiempo se obtuvo que con un 95% de confianza, tanto a 10 mg.L⁻¹ como a 100 mg.L⁻¹ de fenol la presencia de glucosa hizo que el porcentaje de degradación sea más alto y en menor tiempo, en relación a la ausencia de la misma (Figura 3.12).

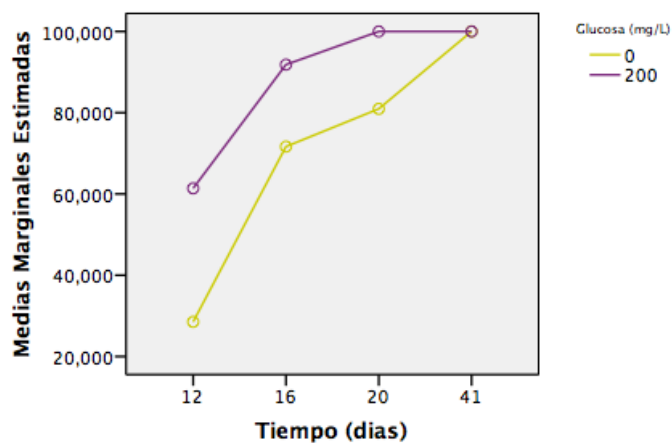


Figura 3.12 Medias marginales estimadas de porcentaje de degradación de fenol con 10 mg.L⁻¹ y 100 mg.L⁻¹, en relación a 0 mg.L⁻¹ y 200 mg.L⁻¹ de glucosa en función del tiempo de incubación.

Se pudo demostrar además que a pesar de no tomar en cuenta los días de incubación, a menor concentración de fenol y presencia de glucosa, el porcentaje de degradación fue mayor, como se muestra en la Figura 3.13 y Tabla 3.5.

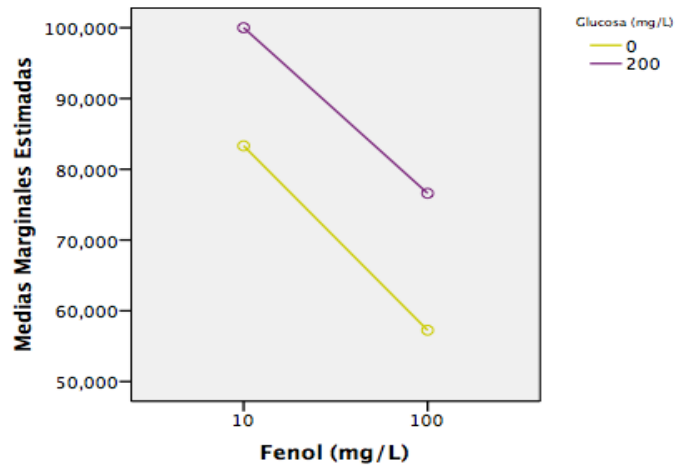


Figura 3.13 Medias marginales estimadas del porcentaje de degradación de fenol, a cualquier tiempo de incubación, tomando en cuenta concentraciones iniciales de fenol con 0 y 200 mg.L⁻¹ de glucosa.

Tabla 3.5 Intervalos de confianza al 95% de la interacción Fenol (mg.L⁻¹) * Glucosa (mg.L⁻¹), donde la variable dependiente es el porcentaje de degradación de fenol.

Fenol (mg/L)	Glucosa (mg/L)	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
10	0	83.314	2.525	78.171	88.456
	200	100.000	2.525	94.858	105.142
100	0	57.253	2.525	52.111	62.396
	200	76.606	2.525	71.464	81.749

Por otra parte, sin considerar la concentración de glucosa, se puede decir con un 5% de error que a menor concentración de fenol, el porcentaje de degradación es más rápido (Figura 3.14 y Tabla 3.6).

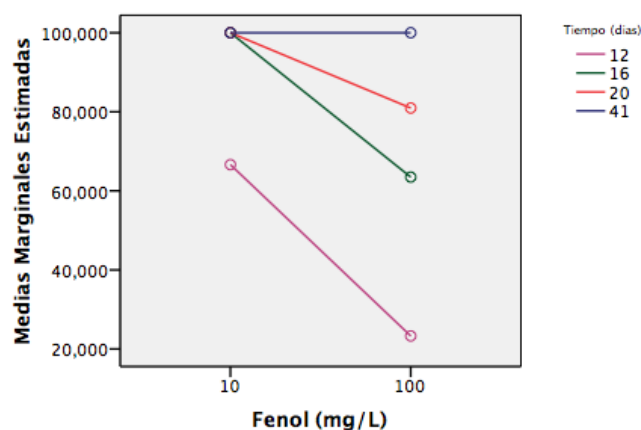


Figura 3.14 Medias marginales estimadas del porcentaje de degradación de fenol a cualquier concentración de glucosa, tomando en cuenta concentraciones iniciales de fenol y días de incubación.

Tabla 3.6 Intervalos de confianza al 95% de la interacción Fenol ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) * Tiempo (días), donde la variable dependiente es el porcentaje de degradación de fenol.

Fenol (mg/L)	Tiempo (días)	Media	Error estándar	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
10	12	66.628	3.570	59.355	73.900
	16	100.000	3.570	92.728	107.272
	20	100.000	3.570	92.728	107.272
	41	100.000	3.570	92.728	107.272
100	12	23.285	3.570	16.013	30.557
	16	63.484	3.570	56.211	70.756
	20	80.951	3.570	73.679	88.223
	41	100.000	3.570	92.728	107.272

3.8 Relación entre controles y tratamientos empleados con el consorcio MS 3

Los controles del diseño experimental de MS 3, en las mismas condiciones, con fenol y sustratos del medio de cultivo (Tabla 2.2), se evaluaron para conocer si existe degradación de fenol debido a factores abióticos como la aireación (150 rpm). Se observó que la concentración de fenol en los controles permanece constante durante todo el tiempo que duró el diseño experimental.

La Figura 3.15 muestra la relación entre el promedio de las unidades experimentales del tratamiento T3 (100 mg.L^{-1} Fenol) y su control con la misma concentración de fenol pero sin inóculo. En los tratamientos T1, T2 y T4 se observó el mismo comportamiento.

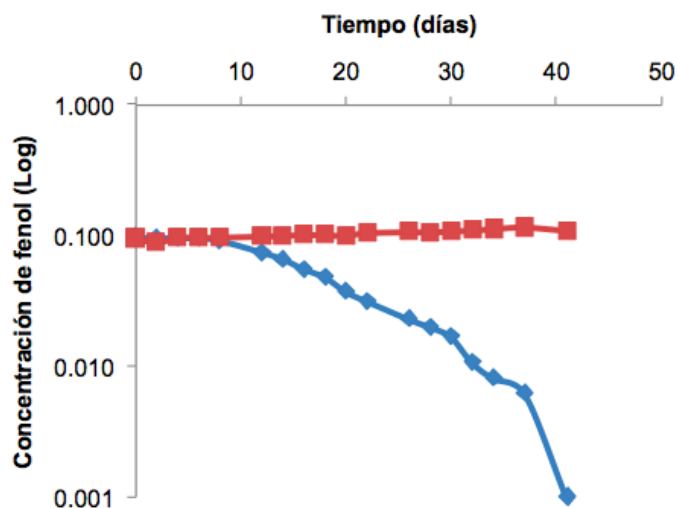


Figura 3.15 Comparación entre la degradación de fenol en el tratamiento T3 (◆), 100 mg.L^{-1} Fenol con 5% de biomasa y su respectivo control (■), en ausencia de biomasa.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

En esta investigación, se evaluó la disminución de concentración de fenol en agua sintética por medio de dos consorcios bacterianos nativos, en condiciones aerobias y anaerobias, a nivel de laboratorio, para su aplicación futura en la biorremediación de efluentes textiles.

El uso de fenol en la industria textil es un factor importante pues producto de procesos de tinción y acabados, se desecha agua residual con cargas de fenol incluidas (CEPIS, 1994). En respuesta a este problema, se han estudiado varias técnicas de eliminación de fenol en aguas, entre ellas físico-químicas y biológicas (Busca *et al.*, 2008). El uso de técnicas biológicas ha sido una alternativa favorable en relación a los métodos físico-químicos debido a que estos últimos resultan ser costosos y producen compuestos secundarios más tóxicos que el fenol propiamente dicho (Arutchelvan *et al.*, 2006).

Se han realizado varios estudios con cepas puras para la degradación de fenol (Hidalgo *et al.*, 2002; Arutchelvan *et al.*, 2006; Agarry & Solomon, 2008; Busca *et al.*, 2008; Cordova *et al.*, 2009); sin embargo, el uso de consorcios es importante pues se puede aumentar la tasa de degradación y superar limitaciones para una completa biodegradación (Ambujom, 2001).

Antes de monitorear el fenol en las unidades experimentales se validó el método para determinación de concentración de fenol en medio de cultivo, el cual cumplió con todos los parámetros y objetivos establecidos.

Los consorcios empleados M 3 e I 5 fueron analizados en otras investigaciones para la remoción de colorantes reactivos (amarillo 84, azul 171, rojo 141) en condiciones aerobias y anaerobias, respectivamente. Así mismo se analizó la posibilidad de remover detergente (lauril sulfato de sodio) y metales pesados (cromo VI, cobre y zinc). De esta manera junto con los análisis realizados en este trabajo con fenol, se pueden sugerir la posibilidad del

empleo de dichos consorcios en futuras aplicaciones para la biorremediación de efluentes textiles.

Inicialmente se analizaron los consorcios M 3 e I 5 sin una previa aclimatación o selección de microorganismos capaces de degradar fenol. A pesar de que la concentración de fenol y biomasa se mantienen constantes en todos los tratamientos con los dos consorcios, se demuestra que la biomasa está viva, lo que significa que los consorcios fueron tolerantes a las concentraciones de fenol empleadas (10, 100 y 400 mg.L⁻¹). Gerginova, Dimova, Ivanova & Alexieva (2007), mencionan que las cepas usadas para la descontaminación de aguas residuales de producción de fenol no solo deberían ser altamente activas, sino también lo suficientemente resistentes al contaminante para poder asegurar la actividad de degradación. Por lo tanto, M 3 e I 5 aún cuando mantienen constante la concentración de fenol en el medio, demuestran ser resistentes a la presencia de fenol. Un resultado similar presenta Muñoz *et al.* (2001), al no observar consumo de fenol cuando *V. nereis* y *A. mysorens* crecieron en 800 mg.L⁻¹ de fenol, indicando que estos microorganismos pueden tolerar dicha concentración de fenol pero son incapaces de usar este compuesto.

La selección de un inóculo con capacidad de degradación de fenol permitió analizar la disminución de la concentración del mismo al aplicar diferentes concentraciones y una fuente alterna de glucosa en determinados períodos de tiempo.

Es importante mencionar que para la selección de MS 3 se partió de M 3 y la diferencia en que los ensayos hayan presentado o no degradación de fenol, posiblemente se deba a la composición del medio de cultivo, en relación a la solución tampón de fosfato. MS 3 fue seleccionado y analizado sin solución tampón puesto que en el estudio previo realizado por Ayala (2010) no se usaba dicho compuesto; mientras que, en M 3 se aplicó dicha solución tampón con el objetivo de unificar el medio de cultivo usado con I 5. Según Prescott, Harley & Klein (2002) la habilidad de crecimiento y el mantener microorganismos en el

laboratorio es posible solo si el medio de cultivo es viable; por lo tanto, en el caso de M 3, la presencia de solución tampón de fosfato pudo impedir el aumento de biomasa y la capacidad de degradar fenol.

Después de haber seleccionado MS 3 fue almacenado en refrigeración a 4°C durante un mes. Al comparar los días iniciales de degradación de fenol en la selección de MS 3 y su activación después del período de almacenamiento, se puede ver que dicha degradación es más lenta, aún cuando se usó la misma concentración inicial de fenol como única fuente de carbono. Esto se puede deber a que el cultivo permaneció refrigerado por un tiempo prolongado y posiblemente fue un cultivo viejo (Prescott *et al.*, 2002).

Una vez realizado el diseño experimental con el consorcio MS 3 bajo condiciones aerobias se pudo determinar que en todos los tratamientos existió un incremento de biomasa. Sin embargo, en el tiempo de incubación que fueron analizadas las unidades experimentales, los tratamientos con concentraciones más altas de fenol (400 mg.L⁻¹) mantuvieron constante su concentración. Estos resultados demuestran que posiblemente con más tiempo de incubación podría existir degradación de fenol, esto se encuentra sustentado por varios autores (Marrot *et al.*, 2006; Agarry & Solomon, 2008), quienes han observado que al incrementar la concentración inicial de fenol se prolongan los tiempos de biodegradación.

Las fases de retardo probablemente representan la adaptación de los microorganismos a las diferentes concentraciones de fenol (Patel & Rajkumar, 2009).

En el caso de los tratamientos suplementados con 200 mg.L⁻¹ de glucosa, se pudo ver en los primeros días de incubación un incremento acelerado de biomasa y una posterior disminución de la misma. Esto pudo ser en consecuencia de que M 3 se encontraba adaptado a concentraciones de 5g.L⁻¹ de glucosa (Ayala, 2010) y al seleccionar MS 3 a partir de M 3 su

capacidad de consumir inicialmente glucosa pudo ser más factible que usar el fenol como primera fuente de carbono. Prescott, Harley & Klein (2002) mencionan que la glucosa es el azúcar de apoyo que proporciona un crecimiento más rápido en cultivos bacterianos, debido a que es una molécula pequeña y fácil de metabolizar.

Estudios realizados por Bajaj, Gallet & Winter (2008) muestran que en todos aclimatados a fenol, existe preferencia por el consumo de glucosa y que el fenol es usado únicamente después que la glucosa ha sido reducida, produciendo una disminución en la tasa de degradación de fenol. En otros estudios (Mamma *et al.*, 2004) por lo contrario, se muestra que la tasa de degradación de fenol incrementa significativamente debido al efecto de combinación de adición de glucosa y células de *P. putida* aclimatadas. Al igual que Mamma *et al.* (2004) en esta investigación la tasa de degradación de fenol es mayor cuando existe la presencia de glucosa.

En los cuatro tratamientos donde existe degradación completa de fenol, se puede observar que el aumento de la biomasa se ve relacionado con la degradación de fenol, esto se debe a que el fenol es usado como fuente de carbono y energía para el crecimiento. Estos resultados se ven relacionados con estudios realizados por Agarry & Solomon (2008), Muñoz *et al.* (2001), entre otros.

Los porcentajes de degradación de fenol varían de acuerdo a cada tratamiento. A pesar de que los tratamientos T1 a T4 llegan a una completa degradación de fenol, el tiempo en que se demora cada uno difiere.

El consorcio MS 3 degrada completamente fenol en mayor tiempo que el cultivo de *Pseudomonas fluorescens* analizado por Agarry y Solomon (2008). Esto ocurre puesto que, en los tratamientos sin glucosa la degradación de fenol es total en los días 16 y 41, para 10 y 100 mg.L⁻¹ de fenol, respectivamente; mientras que, Agarry y Solomon (2008) observan una completa degradación de

100 mg.L⁻¹ de fenol en 84 horas de tiempo de residencia. Hay que tomar en cuenta que la eficacia de una comunidad microbiana depende de la estabilidad de los miembros constituyentes, así como también de su habilidad para degradar o mineralizar el compuesto blanco (Ambujom, 2001).

Lob & Tar (2000) observaron que la tasa de degradación de fenol incrementa con la cantidad de glucosa suplementada, en concentraciones de glucosa bajo 1 g.L⁻¹. Esto probablemente se debe a la producción de masa celular adicional que aumenta la tasa de degradación de fenol. Sin embargo, este mejoramiento en la degradación es de solo un 13%. En este trabajo la adición de glucosa (200 mg.L⁻¹) incrementa el porcentaje de degradación en un 66.75% cuando la concentración inicial de fenol fue de 10 mg.L⁻¹ e incrementa un 38.10% cuando el fenol inicia en 100 mg.L⁻¹, en los días 12 y 20 respectivamente. Los resultados descritos por Ambujom (2001) muestran similitud con los de la esta investigación, debido a que ocurre un incremento del 16 – 20% de fenol degradado al usar 160 mg.L⁻¹ de glucosa y una concentración inicial de fenol de 500 mg.L⁻¹, al analizar un consorcio bacteriano bajo condiciones aerobias.

Similar a los resultados obtenidos por Mamma *et al.* (2004) el porcentaje de degradación de fenol se incrementa significativamente cuando es menor la concentración de fenol y mayor la concentración de glucosa. De la misma manera, al ser más baja la concentración de fenol el tiempo de degradación es menor (Arutchelvan *et al.*, 2006).

Por otra parte, al evaluar los controles de los tratamientos donde ocurrió degradación de fenol y ver que sus concentraciones permanecen constantes, se puede decir al igual que lo reportado por Margesin, Bergauer & Gander (2004) y Marrot, Barrios, Moulin & Roche (2006), que factores abióticos como la aereación no implican la volatilización de fenol y por lo tanto, la concentración que disminuye se atribuye a la biodegradación.

Las aguas residuales analizadas en esta investigación, provenientes de la industria textil, desechan fenol en concentraciones inferiores a 1 mg.L^{-1} . Al obtener como resultado que el consorcio MS 3 puede degradar concentraciones de fenol de 10 y 100 mg.L^{-1} , se puede decir que podría eliminar cargas menores a estas, llegando a 0 mg.L^{-1} , valor que se encuentra por debajo del límite máximo permisible de descarga de fenol en cuerpos de agua dulce para el Ecuador, el cual es de 0.2 mg.L^{-1} .

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

El método de determinación de la concentración de fenol en medio de cultivo se validó cumpliendo todos los parámetros y objetivos planteados.

Los inóculos obtenidos del cepario del Laboratorio de Microbiología de la ESPE, fueron activados efectivamente para su aplicación en los diseños experimentales.

La evaluación de los dos consorcios nativos, en condiciones aerobias (M 3) y anaerobias (I 5), permitieron conocer si son tolerantes a la presencia de fenol en concentraciones de 10, 100 y 400 mg.L⁻¹.

Se seleccionó el inóculo MS 3 capaz de degradar fenol y se lo analizó con un diseño experimental de 2x2x4, donde sus factores fueron fenol (10 y 100 mg.L⁻¹) x glucosa (0 y 200 mg.L⁻¹) x tiempo (días en los cuales el porcentaje de degradación de fenol llegó al 100%), con tres repeticiones.

El porcentaje de degradación de fenol incrementa significativamente cuando es menor la concentración de fenol (10 mg.L⁻¹) y mayor la concentración de glucosa (200 mg.L⁻¹).

El consorcio MS 3 mostró un porcentaje de degradación de fenol mayor 100% y en menor tiempo (12 días) a una concentración de fenol de 10 mg.L⁻¹ y de glucosa de 200 mg.L⁻¹. Mientras que el 100% de degradación con 10 mg.L⁻¹ fenol; 100 mg.L⁻¹ fenol y 200 mg.L⁻¹ glucosa; 100 mg.L⁻¹ fenol; se llegó a los 16, 20 y 41 días respectivamente.

La cantidad de biomasa aumenta, mientras la concentración de fenol disminuye con respecto al tiempo de incubación.

El consorcio MS 3 provocaría una total degradación de fenol en aguas residuales textiles con concentraciones menores a 100 mg.L^{-1} de fenol, cumpliendo con valores menores a los límites máximos permisibles de descarga de fenol en cuerpos de agua dulce para el Ecuador (0.2 mg.L^{-1}).

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Realizar ensayos con cantidades de inóculo mayores a las empleadas en la presente investigación, para determinar si con una mayor concentración de inóculo se obtiene degradación total de fenol en menores tiempos de incubación.

Identificar del consorcio MS 3 los microorganismos que son responsables de la disminución de concentración de fenol y con esta información optimizar los procesos de degradación para futuras aplicaciones.

Es necesario realizar más estudios aplicando el agua residual real de la industria textil para establecer la disminución de la concentración de fenol y conocer si el consorcio MS 3 es capaz de adaptarse al medio para cumplir sus funciones.

Realizar pruebas piloto con el consorcio MS 3y agua residual textil para analizar su comportamiento, debido a que el agua residual a más de contenerfenol contiene otros componentes como: detergentes, colorantes y metales pesados y estos podrían afectar de alguna manera la actividad microbiana.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

ACERCAR Industria - Unidad de Asistencia Técnica Ambiental para la pequeña y mediana empresa. (2004). Guía Ambiental Sector Textil. Bogotá: Autor.

Agarry, S. & Solomon, B. (2008). Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescens*. Int. J. Environ. Sci. Tech. 5(2). 223-232.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2008a). Phenol. CAS 108-95-2; UN 1671 (solid), 2312 (molten), 2821 (solution). Unites States.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2008b). Public health statement. Phenol. CAS # 108-95-2. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Unites States.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2008c). Toxicological Profile for Phenol. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Unites States.

Alves de Lima, A., Pontes, M., Silva, R. & Hofer, E. (2007). Utilization of phenol in the presence of heavy metals by metal-tolerant nonfermentative gram-negative bacteria isolated from wastewater. Revista Latinoamericana de Microbiología. 49(3-4). 68-73.

Ambujom, S. (2001). Studies on composition and stability of a large membered bacterial consortium degrading phenol. Microbiol. Res. 156. 293-301.

Ambujom, S. & Manilal, V. (1995). Phenol degradation by a stable aerobic consortium and its bacterial isolates. Biotechnology letters. 17(4). 443-448.

Amjad, A. & Qay Y. (2007). Potential of plant polyphenol oxidases in the decolorization and removal of textile and non-textile dyes. Journal of Environmental Sciences. 19. 396-402.

Annachatre, A. P., & Gheewala, S. H. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. Biotechnology Advances. 14(1). 35-56.

Arutchelvan, V., Kanakasabai, V., Elangovan, R., Nagarajan, S. & Muralikrishnan, V. (2006). Kinetics of high strength phenol degradation using *Bacillus brevis*. Journal of Hazardous Materials. B129. 216-222.

ASECAL. (2005). Validación de Métodos Analíticos. Madrid. Ronda Toledo.

Asses, N., Ayed, L., Bouallagui, H., Sayadi, S. & Hamdi, M. (2009). Biodegradation of different molecular-mass polyphenols derived from olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. International Biodeterioration & Biodegradation. 63. 407-413.

Ayala, D. (2010). Obtención de un inóculo bacteriano, proveniente de suelo contaminado por agua residual textil, capaz de degradar colorantes textiles reactivos en condiciones aerobias a escala de laboratorio. Tesis de pregrado. Laboratorio de Microbiología. Escuela Politécnica del Ejército.

Bajaj, M., Gallert, C., & Winter, J. (2008a). Biodegradation of high phenol containing synthetic wastewater by an aerobic fixed bed reactor. Bioresource Technology. 99. 8376-8381.

Bajaj, M., Gallert, C., & Winter, J. (2008b). Effect of co-substrates on aerobic phenol degradation by acclimatized and non-acclimatized enrichment cultures. Eng. Life Sci. 8(2). 125-131.

Bajaj, M., Gallert, C., & Winter, J. (2009). Phenol degradation kinetics of an aerobic mixed culture. Biochem. Eng. J. doi:10.1016/j.bej.2009.05.021.

BASF Chemical Emergency Medical Guidelines. (2009). Phenol (C₆H₅OH). Code: E014-007.

Bastos, A., Tornisielo, V., Nozawa, J., Trevors, J. & Rossi, A. (2000). Phenol metabolism by two microorganisms isolated from Amazonian forest soil samples. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 24. 403-409.

Brown, A. (2007). Benson's Microbiological Applications. Ninth Edition. McGraw Hill Higher Education.

Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C. & Arrighi, L. (2008). Review Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. Journal of Hazardous Materials. 160,265-288.

Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). (1994). Informe Técnico sobre la minimización de residuos textiles. Lima: Rojas, C.

Chen, C., Wu, J. & Liu, W. (2008). Identification of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia. WATER RESEARCH. 42. 1963-1976.

Consejería de Sanidad, Dirección General de Salud Pública, Servicio de Sanidad Ambiental. (2007). Riesgo químico - accidentes graves Fenol. Región de Murcia: Europa.

Cordova, S., Dams, R., Cordova, E., Radetski, M., Corrêa, A., & Radetski, C. (2009). Remediation of phenol-contaminated soil by a bacterial consortium and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from an industrial wastewater treatment plant. Journal of Hazardous Materials. 164. 61-66.

Da Ros., G. (1995). La Contaminación de Aguas en el Ecuador: Una aproximación económica. Quito: Abya Yala.

Departamento Técnico Administrativo Medio Ambiente. (2010). Sustitución de Materias Primas para la Industria Textil. Bogotá: Acosta, E..

Department of Environmental Quality Office of Pollution Prevention. (1995). Pollution prevention studies in the textile wet processing industry. Virginia: Hendrickx, I.

Dos Santos, A., Cervantes, F. & Van, J. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. Bioresource Technology. 98. 2369-2385.

Fang, H., Liang, D., Zhang, T. & Liu, Y. (2006). Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. WATER RESEARCH. 40. 427-434.

Fritschi, L., Lakhani, R. & Nadon, L. (2004). Short Communication, Cancer Incidence in Textile Manufacturing Workers in Australia. J Occup Health. 46. 493-496.

Gerginova, M., Dimova, N., Ivanova, D. & Alexieva, Z. (2007). Studies on biodegradation of aromatic pollutants by trichosporon cutaneum yeast strain. Bioremediation of Soils Contaminated with Aromatic Compounds. 67-74.

Hidalgo, A., Jaureguibeitia, A., & Prieto, M. (2002). Biological treatment of phenolic industrial wastewaters by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. Enzyme and Microbial Technology. 31. 221-226.

Huang, J., Wang, X., Jina, Q., Liua, Y. & Wang, Y. (2007). Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite. Journal of Environmental Management. 84. 229-236.

Hughes, S., & Cooper, D. (1996). Biodegradation of Phenol Using the Self-Cycling Fermentation (SCF) Process. Biotechnology and Bioengineering. 51. 112-119.

International Programme on Chemical Safety. (1994). Health and Safety Guide No.88, Phenol, Health and Safety, Guide. World Health Organization. Geneva.

Institute for Health and Consumer Protection (IHCP). (2006). European Union Risk Assessment Report. PHENOL. CAS No: 108-95-2. EINECS No: 203-632-7. European Communities. Italy.

Jiang, H., Tay, J., & Tay, S. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. Appl Microbiol Biotechnol. 63. 602-608.

Jiang, Y., Wen, J., Lan, L. & Hu, Z. (2007). Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the yeast *Candida tropicalis*. Biodegradation. 18. 719-729.

Kanekar, P., Sarnaik, S., & Kelkar, A. (1999). Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacterial isolated from alkaline lake of Lonar, India. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. 85. 128S-133S.

Kumaran, P., & Paruchuri, L. (1997). Kinetics of phenol biotransformation. Wat. Res. 31(1). 11-22.

Lin, Y., Wu, C., Hsu, C., & Li, H. (2009). Biodegradation of phenol with chromium (VI) reduction in an anaerobic fixed-biofilm process-Kinetic model and reactor performance. Journal of Hazardous Materials. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.08.005.

Lob, K. & Tar, C. (2000). Effect of Additional Carbon Sources on Biodegradation of Phenol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 64. 756-763.

Mamma, D., Kalogeris, E., Nikolaos, Papadopoulos, N., Hatzinikolaou, D., Christakopoulos, P., & Kekos, D. (2004). Biodegradation of phenol by acclimatized *Pseudomonas putida* cells using glucose as an added growth substrate. Journal of environmental science and health. A 39(8). 2093-2104.

Margesin, R., Bergauer, P. & Gander, S. (2004). Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: a comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. Extremophiles. 8. 201-207.

Maroto, A. (2002). Incertidumbre en Métodos Analíticos de Rutina. Tesis Doctoral. Facultad de Química. Universitat Tòrrida I Virgili.

Marrot, B., Barrios, A., Moulin, P. & Roche, N. (2006). Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane birreactor. Biochemical Engineering Journal. 30. 174-183.

Mohan, N., Balasubramanian, N. & Ahmed Basha, C. (2007). Electrochemical oxidation of textile wastewater and its reuse. Journal of Hazardous Materials. 147. 644-651.

Moussavi, G., Mahmoudi, M. & Barikbin, B. (2009). Biological removal of phenol from strong wastewaters using a novel MSBR. Water research. 43. 1295-1302.

Moncayo, I. (2010). Remoción de los colorantes textiles reactivos rojo 141, amarillo 84 y azul navy 171 eliminados en el agua residual, utilizando un inóculo compuesto seleccionado, bajo condiciones anaerobias a nivel de laboratorio. Tesis de pregrado. Laboratorio de Microbiología. Escuela Politécnica del Ejército.

Moosvi, S., Keharia, H. & Madamwar, D. (2005). Decolourization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 21. 667-672.

Morrison, R. & Boyd, R. (1998). Zugazagoitia, R., Fiedler, P., & C. Rock (Eds.), Química orgánica. (p.981). México: Pearson.

Moussavi, G., Mahmoudi, M. & Barikbin, B. (2009). Biological removal of phenol from strong wastewaters using a novel MSBR. Water research. 43. 1295-1302.

Muñoz, J., Pérez, B., Esteban, M., De la Escalera, S., Gómez, M., Martínez, M., & González, J. (2001). Growth of Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Sea Water using Phenol as the Sole Carbon Source. Folia Microbiol. 46(4). 297-302.

Patel, R., & Rajkumar, S. (2009). Isolation and characterization of phenol degrading yeast. Journal of Basic Microbiology. 49. 216-219.

Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. (2002). Microbiology, Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.

Prpich, G., & Daugulis, A. (2005). Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor. Biodegradation. 6. 329-339.

Rigo, M. & Alegre, R. (2004). Isolation and Selection of Phenol-Degrading Microorganisms from Industrial Wastewaters and Kinetics of the Biodegradation. Folia Microbiol. 49(1). 41-45.

Rittmann, B. & McCarty, P. (2001). Antonio, G. (Ed.), Biotecnología del medio ambiente. Principios y aplicaciones. (p.289). España: McGRAW-HILL.

Saravanan, P., Pakshirajan, K. & Saha, P. (2008a). Kinetics of phenol and m-cresol biodegradation by an indigenous mixed microbial culture isolated from a sewage treatment plant. Journal of Environmental Sciences. 20. 1508-1513.

Saravanan, P., Pakshirajan, K. & Saha, P. (2008b). Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor. Bioresource Technology. 99. 205-209.

Song, H., Liu, Y., Xu, W., Zeng, G., Aibibu, N., Xu, L. & Chen, B. (2009). Simultaneous Cr(VI) reduction and phenol degradation in pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB91095. Bioresour. Technol. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.060.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Edition. (1998). 5530 Phenols.

Suárez, M., Fernández, S., Gómez J. & Martínez, J. (2007). Cultivos bacterianos autóctonos con capacidad de degradar altas concentraciones de fenoles.

Tziotzios, G., Teliou, M., Kaltsouni, V., Lyberatos, G. & Vayenas, D. (2005). Biological phenol removal using suspended growth and packed bed reactors. Biochemical Engineering Journal. 26. 65-71.

Varma, R.J., & Gaikwad, B.G. (2009). Biodegradation and phenol tolerance by recycled cells of *Candida tropicalis* NCIM 3556. International Biodeterioration & Biodegradation. 63. 539-542.

World Health Organization. (1994). International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 161. Phenol. Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm>

ANEXOS

Anexo A. Preparación de soluciones para la determinación de la concentración de fenol en agua y medio de cultivo por medio del método fotométrico directo (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 5530, 1998)

Reactivos para el procedimiento de limpiado

- a) Solución de ácido fosfórico (10%):** Ácido fosfórico (H_3PO_4 1 + 9), diluir 10 mL de Ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85% hasta 100 mL con agua destilada.
- b) Solución de indicador anaranjado de metilo:** disolver 1 mg de anaranjado de metilo en 5 mL de etanol, 0.05 mL de Ácido clorhídrico (HCl) 0.1N y 45 mL de agua destilada.

Reactivos para el método directo de determinación de concentración de fenol

- a) Hidróxido de amonio (NH_4OH) 0,5 N:** diluir 1.872 mL de Hidróxido de amonio (NH_4OH) 26% en 25 mL de agua destilada.
- b) Solución tampón de fosfato:** disolver 26.125 g de Fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4) y 18.075 g de Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) en agua destilada y diluir hasta 250 mL. El pH debe ser de 6.8.
- c) Solución de 4-aminoantipirina:** disolver 0.1 g de 4-aminoantipirina en agua destilada y diluir hasta 5 mL. Preparar a diario.
- d) Solución de ferricianuro de potasio:** disolver 0.8 g de Ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en agua destilada y diluir hasta 10 mL. Filtrar si es necesario. Almacenar en un frasco ambar. Preparar reciente cada semana.

Anexo B. Ecuaciones de las curvas de calibración con sus respectivos R^2 , para la determinación de la concentración de fenol en muestras de aguas residuales de diferentes industrias textiles en la provincia de Pichincha, Ecuador.

Muestra textil	Ecuación curva de calibración	R^2
T1	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
T2	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
T3	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
T4	$y = 0,129x + 0,002$	0.999
P1	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
P2	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
P3	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
S1	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
S2	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
S3	$y = 0,138x + 0,032$	0.999
E1	$y = 0,127x + 0,002$	0.999
E2	$y = 0,127x - 0,001$	0.999
E3	$y = 0,127x - 0,001$	0.999
E4	$y = 0,127x - 0,001$	0.999
E5	$y = 0,1318x + 0,0002$	1
E6	$y = 0,1318x + 0,0002$	1

Anexo C. Curvas estándar para la validación del método para determinación de la concentración de fenol

Muestra	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	Curva 8	Curva 9	Curva 10
0	0,034	0,046	0,023	0,030	0,017	0,037	0,026	0,036	0,024	0,007
0,1	0,053	0,08	0,037	0,049	0,053	0,054	0,041	0,054	0,048	0,023
0,2	0,061	0,091	0,054	0,063	0,066	0,067	0,054	0,068	0,059	0,032
0,3	0,084	0,104	0,070	0,072	0,076	0,070	0,067	0,077	0,071	0,058
0,4	0,083	0,105	0,080	0,090	0,094	0,093	0,081	0,086	0,082	0,065
0,5	0,112	0,138	0,112	0,101	0,099	0,117		0,121		0,073
1	0,177	0,199		0,171	0,170	0,185	0,186	0,188	0,186	0,137
2	0,31	0,334	0,319	0,312	0,314	0,324	0,321	0,335	0,325	0,272
3	0,47	0,475	0,460	0,469	0,470	0,464	0,460	0,468	0,465	0,394
5	0,718	0,749	0,749	0,741	0,742	0,755	0,755	0,755	0,735	0,694
Ecuación	$y = 0,138x + 0,037$	$y = 0,138x + 0,059$	$y = 0,144x + 0,026$	$y = 0,142x + 0,031$	$y = 0,143x + 0,031$	$y = 0,143x + 0,037$	$y = 0,145x + 0,026$	$y = 0,143x + 0,039$	$y = 0,142x + 0,031$	$y = 0,134x + 0,006$
R²	R ² = 0,998	R ² = 0,999	R ² = 0,999	R ² = 0,999	R ² = 0,999	R ² = 0,999	R ² = 0,999	R ² = 0,999	R ² = 0,999	R ² = 0,998

Las curvas en color azul son aquellas que fueron seleccionadas para la validación del método analítico.

Anexo D. Curva promedio de calibración para realizar los cálculos de concentración de fenol en todas las unidades experimentales con los tres consorcios (M 3, I 5 y MS 3) y la validación del método analítico.

Muestra	PROMEDIO
0	0,028
0,1	0,044
0,2	0,057
0,3	0,071
0,4	0,083
0,5	0,106
1	0,174
2	0,313
3	0,455
5	0,738

