

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE PCB's EN ACEITE
DIELÉCTRICO DE TRANSFORMADOR REALIZADA POR CONSORCIOS
MICROBIANOS**

DAVID JAVIER ROSADO PORTO

**SISTEMA UNIVERSITARIO ESTATAL DEL CARIBE COLOMBIANO
SUE-CARIBE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
CARTAGENA, DICIEMBRE 2015**

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE PCB's EN ACEITE
DIELÉCTRICO DE TRANSFORMADOR REALIZADA POR CONSORCIOS
MICROBIANOS**

DAVID JAVIER ROSADO PORTO

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Magíster en Ciencias
Ambientales**

**DIRECTORA
ARACELY GARCÍA CUAN**

**SISTEMA UNIVERSITARIO ESTATAL DEL CARIBE COLOMBIANO
SUE-CARIBE
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
CARTAGENA, DICIEMBRE 2015**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Cartagena, __ de Diciembre de 2015

A mi Dios Todopoderoso, por haber bendecido mi vida con su gracia y amor, permitiéndome alcanzar satisfactoriamente esta meta con éxito, a pesar de las dificultades que se presentaron durante el camino.

A mis padres Meira y Edison por su apoyo incondicional y por depositar su confianza en mí, Gracias por su esfuerzo.

A mi hermanita Adriana, gracias por estar a mi lado y prestarme tu ayuda cuando fue necesaria.

A mi amada novia Jenifer, por siempre apoyarme e impulsarme a realizar esta maestría, gracias a tí por ayudarme a crecer como persona.

A todos mis amigos, a Mario, Rubén, Oscar, Adriana, que de una u otra forma fueron parte de esta experiencia maravillosa. Los llevaré siempre en mi corazón.

A las profesoras Aracely García y Ana Medina, por compartir sus valiosos conocimientos conmigo.

David J.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento:

A **ARACELY GARCÍA CUAN**, Directora del Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (IMB) de la Universidad Libre Seccional Barranquilla, por sus valiosas enseñanzas durante el desarrollo del proyecto.

A **ANA MEDINA BUELVAS**, Docente investigadora de la Universidad Libre, por sus consejos y orientaciones.

A **MARIO PEÑA FREYLE Y RUBÉN BARRIOS ARAUJO**, Microbiólogos miembros del grupo IMB, por su constante colaboración en el laboratorio.

A **NIVALDO ROSALES**, Ingeniero Eléctrico, representante ambiental de Electricaribe S.A. E.S.P., por su confianza y apoyo para el desarrollo de este proyecto.

Al **LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA DE LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**, A LA DOCTORA ELENA STASHENKO Y A DEYANIRA CABALLERO, por su dedicación, trabajo de excelente calidad y asesoría cuando fue requerida.

A todos los que de una u otra forma contribuyeron a la realización de éste trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO DE REFERENCIA	15
Generalidades	15
Propiedades Físico-Químicas de los PCB's	15
Aplicaciones de los PCB's	17
Aceites Dieléctricos	18
Aspectos tóxicológicos de los PCB's	19
Convenio de Estocolmo	20
Marco legal para el manejo de PCB's en Colombia	22
3. MARCO TEÓRICO	25
Biodegradación de PCB's	25
Rutas de biodegradación de PCBs.	25
Degradación anaerobia de PCB's - Declorinación Reductiva	25
Degradación aerobia de PCB's – Metabolismo oxidativo	28
Biodegradación de PCB's por hongos	30
Consortios microbianos	31
4. METODOLOGÍA	33
Etapas	
Etapas 1. Obtención y caracterización del aceite dieléctrico	33
Etapas 2. Esterilización del aceite dieléctrico de transformador	33
Etapas 3. Obtención y activación de consorcios	34
Etapas 4. Purificación y aislamiento de cepas de los consorcios	34
Etapas 5. Curvas de crecimiento de bacterias de los consorcios	35

Etapa 6. Obtención de biomasa bacteriana.....	35
Etapa 7. Preparación de suspensión de esporas.....	36
Etapa 8. Montaje de los ensayos de biodegradación	36
Etapa 9. Determinación de microorganismos degradadores	38
Etapa 10. Medición de pH y temperatura de los ensayos de biodegradación	38
Etapa 11. Extracción de las muestras y análisis cromatográfico.....	38
Etapa 12. Análisis de datos.....	39
5. RESULTADOS	41
Caracterización del aceite dieléctrico de transformador.	41
Aislamientos de microorganismos de la flora endógena de aceite dieléctrico	41
Purificación e identificación de microorganismos de consorcios.....	41
Resultados curvas de crecimiento bacteriano.....	43
Resultados ensayos de degradación de PCB	44
Curvas de crecimiento de consorcios degradadores en presencia de PCB ..	49
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
7. CONCLUSIÓN.....	59
8. ANEXOS.....	60
Anexo 1. Resultados de concentración de PCB en aceite dieléctrico de transformador	60
Anexo 2. Aislamiento de hongos y bacterias	61
Anexo 3. Tinción de gran de aislamientos bacterianos aerobios y anaerobios	62
9. BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los PCB	16
Tabla 2. Descripción y ejemplos de los usos de PCB.....	17
Tabla 3. Hidrocarburos contenidos en aceites dieléctricos	18
Tabla 4. Reactivación y purificación de consorcios reactivados	41
Tabla 5. Resultados de observación microscópica de bacterias aerobias y anaerobias aisladas	42
Tabla 6. Concentración de PCB por tratamiento evaluado	44
Tabla 7. Porcentaje de degradación y porcentaje de PCB residual por tratamiento	45
Tabla 8. Curvas de crecimiento de ensayos de degradación	50
Tabla 9. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de consorcios.....	53
Tabla 10. Constante de Monod de cada cultivo ensayado	54

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Estructura Química de BifeniloPoliclorado.....	15
Ilustración 2. Rutas de dechlorinación reductiva microbiana	28
Ilustración 3. Ruta catabólica de los Bifenilos y biodegradación de PCBs.....	30
Ilustración 4. Curvas de crecimiento de bacterias aisladas	43
Ilustración 5. Porcentaje de degradación de PCB por tratamiento evaluado	45
Ilustración 6. Degradación de PCB por consorcio de bacterias aerobias.....	46
Ilustración 7. Degradación de PCB por consorcio de hongos	47
Ilustración 8. Degradación de PCB por consorcio de bacterias anaerobias	48
Ilustración 9. Degradación de PCB por consorcio de bacterias anaerobias y aerobias	49
Ilustración 10. Curvas de crecimiento de ensayos con bacterias aerobias en presencia de aceite dieléctrico con PCB.....	50
Ilustración 11. Curvas de crecimiento de ensayos con bacterias anaerobias en presencia de aceite dieléctrico con PCB.....	51
Ilustración 12. Curvas de crecimiento de ensayos mixtos en presencia de aceite dieléctrico con PCB.....	51
Ilustración 13. Curvas de crecimiento de ensayos con hongos en presencia de aceite dieléctrico con PCB.....	52
Ilustración 14. Fotografía de aislado de <i>Aspergillus flavus</i> en agar sabouraud	61
Ilustración 15. Fotografía de aislado de <i>Aspergillus fumigatus</i> en agar sabouraud	61
Ilustración 16. Fotografía de aislados de <i>Bacillus</i> sp. en agar nutritivo.....	61
Ilustración 17. Fotografías de tinción de gram de <i>Bacillus</i> sp. células gram positivas con presencia de endoesporas mediales.....	62
Ilustración 18. Fotografías de tinción de gram de aislados de <i>Clostridium</i> sp. células en forma de bastón gram positivas y con esporas terminales	62

RESUMEN

Los Bifenilos policlorados (PCB's) son moléculas xenobióticas que contienen en su estructura átomos de carbono, hidrógeno y cloro; son muy estables, no conducen la electricidad y son poco volátiles a temperaturas normales. Las consecuencias asociadas a la exposición a este grupo de compuestos incluyen, efectos carcinogénicos, genotóxicos, teratógenos, alteraciones en la reproducción. En Colombia de acuerdo al Inventario Preliminar de Compuestos PCB, se ha estimado que solo en el país hay una cantidad de PCB's entre 11585 Ton a 19256 Ton en transformadores y otros equipos contaminado. Sin embargo, actualmente son escasos los reportes de degradación realizadas por cepas individuales o consorcios de microorganismos, en los cuales se trabajen matrices complejas contaminadas con PCB's, como lo es el aceite dieléctrico para transformador altamente contaminado.

Por lo cual este proyecto tiene como objetivo general el de evaluar la biodegradación de PCB's en aceites dieléctricos de transformador realizada por consorcios de bacterias aerobias y anaerobias y hongos. Se utilizaron cuatro consorcios (bacterias aerobias, bacterias anaerobias, hongos y un ensayo mixto), y se realizó la determinación de la capacidad de degradación con y sin la adición de una fuente de carbono adicional, midiendo la concentración de PCB's y la biomasa microbiana; los ensayos de degradación se realizaron en medio mínimo mineral adicionado con aceite dieléctrico estéril contaminado con PCB's, ajustando la concentración final del contaminante a 250 ppm.

Los resultados de los ensayos demuestran que 4 de los 8 tratamientos presentaron una disminución de la concentración de PCB's superior al 50%. Al día 20 de evolución los ensayos de bacterias aerobias con acetato y hongos presentaron un nivel de degradación superior al 75%, siendo significativamente inferiores las concentraciones residuales de PCB a las del grupo control. Asimismo, la adición de una fuente de carbono alternativa no estimuló la reducción de PCB's en los tratamientos de Hongos, bacterias anaerobias y mixto, siendo el de bacterias aerobias el único en que la fuente de carbono alternativa aumentó la degradación.

Palabras clave: Bifenilos policlorados, degradación microbiana, aceite dieléctrico.

ABSTRACT

Polychlorinated biphenyls (PCB's) are xenobiotic molecules that contain in its structure carbón, hydrogen and chlorine atoms; they are very stable, do not conduit electricity and are not very volatile at normal temperature. The consequences associated with the exposition to these compounds include carcinogenic, genotoxic, teratogenic effects and reproduction alterations. In Colombia, according with the Preliminary Inventory of PCB Compounds, It has been estimated that only on the country there is an amount of PCB between 11585 Ton to 19256 Ton into transformers and other equipment contaminated. Nevertheless, the reports about the degradation made by individual strains or consortia of microorganisms are few on complex matrices contaminated with PCB, like it is the transformer's dielectric oil very contaminated.

Therefore, this project has as a general objective to evaluate dielectric oil's PCB biodegradation made of by aerobic bacteria, anaerobic bacteria and fungi. It was used four microorganisms consortia (aerobic bacteria, anaerobic bacteria, fungi, mix assay) and was determinated the biodegradation capability with and without an additional carbon source, measuring PCB concentration and microbial biomass; biodegradation assays were performed in minimal salt media with steryl dielectric oil contaminated with PCB, adjusting final concentration to 250 ppm.

Results show that 4 of 8 treatments presented a dismutation of PCB concentration over 50%. At day 20 of the experiments aerobic bacteria and fungi treatments presented a degradation level over 75%, being PCB residual concentration significantly inferior to control group. On the other hand, alternative carbon source addition did not stimulate the reduction on PCB concentration in fungi, anaerobic bacteria and mix treatments, only on aerobic bacteria the alternative carbon source increased the degradation.

Keywords: Polychlorinated biphenyls, microbial degradation, dielectric oil.

1. INTRODUCCIÓN

Los Bifenilospoliclorados (PCB's) son moléculas sintéticas compuestas de átomos de carbono, hidrógeno y cloro. Se producen sustituyendo entre uno y diez átomos de hidrógeno por átomos de cloro en la molécula bifenilo. Esto da como resultado 209 combinaciones posibles de compuestos de PCB's [1] [2]. Debido a sus propiedades físicas y químicas son muy estables, no conducen la electricidad y son poco volátiles a temperaturas normales; por éstas y otras propiedades fueron ampliamente utilizados en diversos sectores industriales, principalmente en el sector eléctrico, en el fluido dieléctrico de los transformadores de energía [3].

El uso masivo de los PCB's junto con su resistencia a la degradación fisicoquímica y biológica por procesos naturales ha contribuido a su dispersión y acumulación en el medio ambiente. Las consecuencias asociadas a la exposición a este grupo de compuestos incluyen, efectos carcinogénicos, genotóxicos, teratógenos, alteraciones en la reproducción; condiciones que contribuyen al deterioro ecológico y a lesiones de la salud humana, por lo cual los PCB's representan un grave problema de contaminación ambiental y en un peligro para la salud de los seres humanos [4] [5].

En Colombia de acuerdo al Inventario Preliminar de Compuestos de BifenilosPoliclorados (PCB), se ha estimado que solo en el país hay una cantidad de PCB's entre 11585 Ton a 19256 Ton en transformadores y otros equipos contaminados, de los cuales aproximadamente una tercera parte corresponden a PCB líquido, presente en transformadores y canecas en almacenamiento, cantidad que corresponde a 2662 Ton, tan solo en los sectores eléctrico, de manufactura y transportes [2]. Por lo tanto, el almacenamiento de los equipos inactivos y de los aceites con PCB es una actividad crítica para cualquier empresa pública o privada con existencias de PCB, por cuanto el Decreto 4741 de 2005 estableció que el almacenamiento de residuos o desechos peligrosos en instalaciones del generador no puede sobrepasar de un año [6]. A su vez, la resolución 222 de Diciembre de 2011 en el Capítulo IV artículo 27, establece que los propietarios de existencias y desechos contaminados con PCB's en el territorio nacional deberán

haberlos eliminado, de manera ambientalmente adecuada, a más tardar en el año 2028 de acuerdo con metas de eliminación especificadas en el mismo artículo [7].

Con base en lo anterior, se establece la necesidad de desarrollar tratamientos químicos, físicos y biológicos que eliminen o reduzcan la presencia de los PCB's. Los microorganismos tienen la capacidad de degradar la mayoría de los componentes de hidrocarburos naturales, especialmente: alcanos saturados e insaturados, monoaromáticos e hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular [8] [9], por lo cual la degradación microbiana se convierte en una herramienta fundamental para la consecución de dichos objetivos, debido a la gran versatilidad metabólica de éstos para la obtención de energía y producción de biomasa a partir de compuestos tóxicos altamente recalcitrantes [10] [11].

Motivo que ha impulsado el desarrollo de trabajos a nivel regional destinados al aislamiento y estudio de microorganismo de suelos con antecedentes de contaminación con PCB's, logrando aislar cepas bacterianas y fúngicas tolerantes, que se desarrollan en medios de cultivo con aceites dieléctricos usados contaminados con PCB's y el congénere Aroclor 1260 [12] [13] [14] [15]. Sin embargo, actualmente son escasos los reportes de degradación realizadas por cepas individuales o consorcios de microorganismos, en los cuales se trabajen matrices complejas contaminadas con PCB's, como lo es el aceite dieléctrico de transformador altamente contaminado. Asimismo, existen una serie de variables que afectan directamente la capacidad de los microorganismos de degradar cualquier compuesto contaminante. Por lo cual es fundamental la evaluación del proceso de biodegradación, analizando los factores que influyen en la actividad de los microorganismos, con el fin acelerar procesos de degradación, buscando así, desarrollar una tecnología efectiva y eficiente que permita la descontaminación y/o eliminación de las grandes existencias de PCB's que se encuentran en Colombia, tanto en aceites de transformador, como en otro tipo de matrices. Permitiendo de esta forma cumplir con las metas establecidas por la legislación nacional de eliminación de PCB's.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo general, evaluar la biodegradación de PCB's en aceites dieléctricos de transformador realizada por consorcios de bacterias aerobias, bacterias anaerobias y hongos; y como objetivos específicos cuantificar el nivel

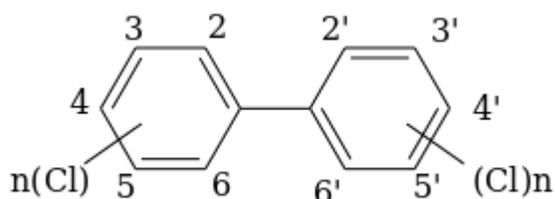
de reducción de la concentración de PCB's en aceites dieléctricos, monitorear la flora microbiana aerobia y anaerobia durante los procesos de degradación de PCB's, determinar el efecto de la adición de una fuente de carbono externa en el proceso de biodegradación y contrastar los niveles de reducción de PCB's entre los tratamientos de degradación evaluados.

2. MARCO DE REFERENCIA

Generalidades

La sigla PCB proviene del término en inglés “Polychlorinated Biphenyls” que en español significa Bifenilos Policlorados o Difenilos Policlorados (DPC). Los PCB's son una familia de 209 congéneres, estas sustancias químicas orgánicas están compuestas de dos anillos bencénicos unidos por un enlace carbono - carbono. Los átomos de cloro se sustituyen en uno o en los diez lugares disponibles restantes (Ilustración 1). El número y la posición de los átomos de cloro determinan la clasificación y propiedades de los distintos congéneres [16].

Ilustración 1. Estructura Química de BifeniloPoliclorado



Fuente: Y. Lai, W. Pan, S. Ni, D. Zhang y J. Zhan, «Theoretical evaluation of the configurations and Raman spectra of 209 polychlorinated biphenyl congeners,».2011 [17]

Fueron fabricados por primera vez en 1929 y su uso se extendió rápidamente como fluido de equipos eléctricos. Se ha estimado que la producción mundial acumulada debe estar en el orden de 1,5 millones de Ton. Se ha reportado la producción mundial total de 1.324.000 Ton entre 1930 y 1993, sin embargo, lo más probable es que la verdadera producción mundial acumulada haya sido mayor, ya que había fábricas en Polonia, Alemania Oriental y Austria que produjeron PCB en cantidades desconocidas [18].

Propiedades Físico-Químicas de los PCB's

Los PCB's son de aspecto líquido aceitoso o sólido incoloro o amarillo claro, no tienen olor ni sabor. Varían desde líquidos claros, aceitosos, hasta sólidos amarillentos, cerúleos según el grado de cloración. Los congéneres de PCB que componían los productos

comerciales oscilaron en su peso molecular 291,98 a 360,86 g/mol. Aunque se utilizaron numerosos nombres comerciales, el nombre "Aroclor" es ampliamente reconocido y asociado con PCB. Los productos Aroclor (A) fueron diseñados por un conjunto de cuatro números, los dos primeros de los cuales se indica que la molécula era un bifenilo (12 carbonos) y las dos últimas que indica el contenido de cloro promedio del producto, por ejemplo, A1221 contiene un promedio de 21% de cloro. Los productos comerciales existían en forma de aceites móviles (A1221-1248), líquidos viscosos o resinas pegajosas (A1250-1262) o sólidos ($A \geq 1268$). Sus presiones de vapor eran tales que la volatilización era posible (Aroclor 1242; Aroclor 1254). Del mismo modo, sus solubilidades en agua, aunque bajo, eran suficientes para permitir el movimiento en agua (Aroclor 1242, Aroclor 1254). Todos los productos que contienen PCB tenían una buena solubilidad en solventes orgánicos [19] (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los PCB

PROPIEDAD	VALORES
Peso molecular	Rango: 291.48–360.86 Promedio: A1242: 261
Forma	A1221-28: Aceites fluidos A1250-62: Líquidos viscosos o resinas pegajosas A>1268: Sólidos
Presión de Vapor	A1242: 4.0×10^{-4} mm Hg at 21 °C A1254: 7.7×10^{-5} mm Hg at 21 °C
Solubilidad en agua ($\mu\text{g/L}$)	A1242: ~200 A1254: 70
Solubilidad en solventes (wt%)	Soluble en los solventes orgánicos comunes
HLC $\text{atm m}^3/\text{mole}$	A1242: 3.43×10^{-4} A1254: 2.83×10^{-4}
Log K_{ow}	A1242: 4.11 A1254: 6.30 (estimado)
Log K_{oc}	A1242: 3.35-5.17 A1254: 5.0–6.1

Fuente: M. L. Hardy, «A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products».2002 [19]

Aplicaciones de los PCB's

Los principales usos de PCB's fueron en el sector industrial y comercial. Se les dieron aplicaciones en fluidos dieléctricos para condensadores y transformadores principalmente [20] [19]. También se utilizaron PCB's en sistemas hidráulicos, por ejemplo, en equipos de minería y de transferencia de calor, en lubricantes, selladores de empaquetaduras, pinturas, plaguicidas, adhesivos, papel carbón, guarniciones de freno y asfalto. Las aplicaciones no eléctricas incluyen su uso en tuberías de gas, edificios, naves y para la investigación [21].

Tabla 2. Descripción y ejemplos de los usos de PCB

Usos	Descripción	Ejemplos
Sistemas cerrados	Son unidades selladas o cerradas, donde los PCB se mantienen dentro del equipo. En condiciones normales de estos sistemas, los usuarios o el medio ambiente no se encuentran expuestos a los PCB. Las emisiones de PCB pueden ocurrir en actividades de mantenimiento y reparación o como resultado de un daño del equipo (incendio)	PCB como fluidos dieléctricos en: <ul style="list-style-type: none"> - Condensadores - Transformadores - Motores eléctricos - Balastos de equipos de iluminación - Electroimanes
Sistemas parcialmente cerrados	Son sistemas en los cuales los PCB no están expuestos directamente al medio ambiente; sin embargo, pueden llegar a liberarse periódicamente por el uso del equipo	PCB como aceites en: <ul style="list-style-type: none"> - Intercambiadores de calor - Sistemas hidráulicos - Bombas de vacío
Sistemas abierto	En este caso, los PCB son constituyentes de otros productos que encuentran fácilmente en contacto con el medio ambiente y el ser humano	<ul style="list-style-type: none"> - Tintas - Lubricantes - Retardantes de llama - Pesticidas - Materiales aislantes - Adhesivos - Pinturas - Plastificantes

Fuente: Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Dirección desarrollo sectorial sostenible, *Inventario preliminar de Compuestos Bifenilos Policlorados (PCB) existente en Colombia, Bogotá, 2007.* [2]

La aplicación comercial de los PCB's puede agruparse desde el punto de vista ambiental en 3 categorías: Sistemas cerrados, sistemas parcialmente cerrados y sistemas abiertos (Tabla 2).

Aceites Dieléctricos

Tabla 3. Hidrocarburos contenidos en aceites dieléctricos

Hidrocarburos (% m/v)	Aceite parafínico			Aceite nafténico		
Parafinas totales	80.8			70.6		
Iso- (ramificados)		23.0			11.4	
Ciclo- (naftenos)		57.8			59.2	
1-anillo			23.3			16.3
2-anillos			16.0			16.8
3-anillos			11.7			12.2
4-anillos			6.8			10.0
5-anillos			0.0			3.9
6-anillos			0.0			0.0
Aromáticos totales	19.2			29.4		
Mono-		12.6			18.3	
Alquilbencenos			4.5			4.9
Nafteno bencenos			4.0			6.0
di-nafteno bencenos			4.0			7.4
Di-		4.8			8.7	
Naftalenos			2.2			4.1
Acenanaftenos, dibenzofuranos			1.5			2.5
Fluorenos			1.1			2.1
Tri-		0.4			0.7	
Fenantrenos			0.4			0.6
Nafteno fenantrenos			0.0			0.1
Tetra-		0.4			0.3	
Pirenos			0.3			0.1
Crisenos			0.1			0.2
Penta-		0.0			0.0	
Sulfuro heterocíclicos		0.8			1.2	
Benzotiofenos			0.6			0.6
di-benzotiofenos			0.1			0.6
Nafteno benzotiofenos			0.0			0.0
No identificados		0.2			0.2	
Compuestos polares	0.0			0.0		

Fuente: K. Rapp, «Coking Tendency of Dielectric Fluids at Contact Surfaces – Phase I: Constant Current,» 2003. [22]

Los aceites minerales usados comúnmente en los transformadores son nafténicos, lo que se refiere al alto contenido de compuestos cíclicos presentes. El aceite también contiene

componentes menores como oxígeno, azufre, nitrógeno, metales y agua, lo cual varía de acuerdo al grado de refinamiento llevado a cabo. Grados de aceite han sido desarrollados de acuerdo con la cantidad de poder que pasará a través del transformador. Esta no es la única manera en que la composición varía, también cambiará la composición material de aceite crudo utilizado [23].

La composición del aceite de transformador está comprendida predominantemente por hidrocarburos saturados con 15 a 30 átomos de carbono (tabla 3). Los compuestos insaturados mantenidos al mínimo para mejorar la estabilidad de los aceites y disminuir la tendencia a formar lodos. Los hidrocarburos aromáticos constituyen el resto de la composición del aceite del transformador, los aromáticos son sustituidos con grupos alquilo y otras estructuras de anillos. Los aceites de transformador contienen pequeñas cantidades de otros compuestos, como oxígeno, nitrógeno y azufre contenidos en anillos heterocíclicos, lo que contribuye a la inestabilidad oxidativa [22].

Aspectos toxicológicos de los PCB's

Las propiedades físicas y químicas de los diferentes congéneres de PCB, que determinan su presencia relativa en los diferentes compartimentos ambientales, medida en un amplio rango (por ejemplo, 4.46 a 8.18 para el log K_{OW} y de 6.65 a 11.96 para el log coeficiente de partición octanol -aire (K_{OA})). Todos los 209 congéneres de PCB tienen combinaciones K_{OA} - K_{OW} que les dan un alto potencial de bioacumulación en los seres humanos, son persistentes en el medio ambiente y no se metaboliza fácilmente [19] [24]. La bioacumulación de PCB en los seres humanos se produce a través de la partición de PCBs del aire y el agua en las plantas terrestres y organismos acuáticos autótrofos y los invertebrados de los niveles tróficos más bajos, seguido de la transferencia a través de las cadenas alimentarias [24]. No obstante, la preocupación mayor consiste en los efectos adversos causados por la exposición prolongada, incluso a niveles bajos de estos compuestos. Los PCB's pueden ingresar al organismo a través del contacto con la piel, por inhalación de los vapores o por ingestión con alimentos contaminados [3].

La exposición a los PCB's ha sido reportada por causar una amplia gama de efectos biológicos tanto en humanos como en animales, tales como perturbaciones de las

funciones endocrinas y la síntesis de hormonas sexuales [25] [26] [27] [28], defectos reproductivos, daño en el ADN e inducción de la muerte celular [29] [30] [31] [32].

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), el Programa Nacional de Toxicología (NTP), y la EPA todos consideran los PCB como cancerígenos en animales. Sin embargo, el panorama es menos claro cuando se trata de seres humanos. La EPA actualmente clasifica los PCB como "probables carcinógenos humanos". La IARC clasifica los PCBs como "probablemente carcinogénicos para los humanos (Grupo 2A)". "EINTP clasifica los PCBs como "se anticipa razonablemente que sea carcinógeno humano". Por el contrario, otros productos químicos similares ambientales regulados como las dioxinas, por ejemplo, son universalmente clasificados como carcinógenos humanos conocidos.

Convenio de Estocolmo

El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's), es un tratado internacional cuyo objetivo es proteger la salud humana y el medio ambiente de los productos químicos altamente nocivos y persistentes [33]. El Convenio exige a las partes eliminar y / o reducir los contaminantes orgánicos persistentes, que tienen un potencial de causar efectos devastadores como el cáncer y disminución de la inteligencia, además de tener la posibilidad de viajar a grandes distancias. Por "Parte" se entiende un Estado o una organización de integración económica regional que haya consentido en someterse a las obligaciones establecidas en el presente Convenio y en los que el Convenio está en vigor. Éste tratado internacional fue adoptado en 2001 y entró en vigor en 2004 [34].

El Convenio de Estocolmo es administrado por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). El PNUMA es el organismo ambiental internacional líder que apoya el programa y la aplicación de la sostenibilidad ambiental de las Naciones Unidas. El papel de las Partes es la de implementar las obligaciones del Convenio, incluyendo la eliminación o restricción de la producción y el uso de los COP producidos intencionalmente, prohibir y eliminar la producción y el uso o la importación de los contaminantes orgánicos persistentes, la realización de la investigación, la identificación

de áreas contaminadas con contaminantes orgánicos persistentes, y la disponibilidad financiera apoyo e incentivos para la Convención [35].

Inicialmente, doce COPs han sido reconocidos como causantes de efectos adversos en los seres humanos y el ecosistema y estos se pueden colocar en 3 categorías:

- Los pesticidas: aldrina, clordano, DDT, dieldrina, endrina, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex, toxafeno;
- Productos químicos industriales: hexaclorobenceno, **bifenilos policlorados (PCB's)**, y
- Subproductos: hexaclorobenceno; dibenzo-*p*-dioxinas y dibenzofuranos policlorados (PCDD / PCDF).

Colombia no se encuentra exenta de esta problemática y para el año 2001 entra en vigor el convenio de Estocolmo firmado por el Gobierno Nacional y ratificado mediante la Ley 1196 del 5 de julio del 2008. Por ello, en los últimos años, se han desarrollado estudios y actividades que han permitido conocer y analizar la situación nacional de los COP's en una primera fase, determinándose: existencia de plaguicidas obsoletos en diferentes partes del país y zonas contaminadas por el enterramiento de estos; carencia de instalaciones apropiadas para eliminación de COP y dificultades para acceder al uso de tecnologías menos contaminantes. Conjuntamente con la asesoría del proyecto CERI realizado con la cooperación técnica del gobierno de Canadá, se llevó a cabo el "Primer inventario nacional de PCB", oportunidad en la cual se identificó que la principal problemática del país en cuanto a la contaminación ambiental y de los suelos por PCB, se presentaba por un almacenamiento inadecuado de equipos eléctricos y aceites que contienen PCB como consecuencia de la falta de información de los riesgos asociados a esta práctica. En la mayoría de los casos, el almacenamiento se realiza a la intemperie, sin sistemas de contención, sin elementos para la atención de emergencias ni señalización o identificación [2].

Actualmente el país se encuentra en el proceso de adopción del Plan Nacional de Aplicación del Convenio de Estocolmo-PNA, el cual tiene como propósito la adopción de las medidas tendientes a reducir o eliminar las liberaciones de COP a fin de proteger la salud humana y el medio ambiente. El Plan Nacional de Aplicación se divide en cuatro planes de acción: plan para Plaguicidas, para PCB, para Dioxinas y Furanos y plan de Acciones Transversales.

Marco legal para el manejo de PCB's en Colombia

Entre las Normas colombianas que forman el marco de referencia para las actividades relacionadas con el almacenamiento, transporte, tratamiento, destrucción, importación o exportación de residuos peligrosos, incluyendo los PCB's, se encuentran:

- **Decreto-Ley 2811 de Diciembre 18 de 1974:** por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente. En el TITULO III, reglamentado por la Resolución 2309 de 1986, el artículo 35 establece la prohibición de descargar, sin autorización, los residuos, basuras y desperdicios y, en general, los desechos que deterioren los suelos o causen daño o molestia a individuos o núcleos humanos.
- **Decreto 02 de 1982 del Ministerio de Salud:** Normas y parámetros de calidad del aire, rangos y límites de emisión permisibles.
- **Decreto 1594 de 1984:** el cual reglamenta los usos del agua y los vertimientos.
- **Resolución 2309 de Febrero 24 de 1986,** la cual dicta normas referentes a Residuos Especiales.
- **Convenio de Basilea de Marzo 22 de 1989:** establece los procedimientos para el Control de los Movimientos Transfronterizos de los Desechos Peligrosos y su Eliminación

- **Ley 99 de diciembre de 1993:** por la cual se crea el Ministerio del Medio Ambiente, se reorganiza el sector público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables, se organiza el Sistema Nacional Ambiental -SINA- y se dictan otras disposiciones.
- **Decreto Reglamentario 1753 de Agosto 3 de 1994:** modificado por la Resolución 655 de 1996: Por el cual se reglamentan parcialmente los Títulos VIII y XII de la Ley 99 de 1993 sobre licencias ambientales.
- **Resolución 189 de Julio 15 de 1994 emanada del Ministerio del Medio Ambiente:** dicta regulaciones para impedir la introducción al territorio nacional de residuos peligrosos, establece criterios de clasificación de los Residuos Tóxicos y presenta la Lista de Sustancias, Elementos o Compuestos que confieren toxicidad a un Residuo, en la cual se encuentran contenidos los compuestos orgánicos halogenados, incluyendo los Bifenilos Policlorados, PCB's.
- **Ley de la República 253 de 1996:** mediante la cual Colombia se adhiere al Convenio de Basilea.
- **Ley 430 de Enero 16 de 1998:** “por la cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental referentes a los desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones”, regula lo relacionado, entre otros, con la responsabilidad por el manejo integral de los desechos peligrosos generados en el país y en el proceso de producción, gestión y manejo de los mismos.
- **Resolución 0415 de Mayo 13 de 1998 del Ministerio del Medio Ambiente:** se establecen los casos en los cuales se permite la combustión de desechos y las condiciones técnicas para realizar la misma”.
- **Decreto 321 del 17 de Febrero de 1999:** “por el cual se adopta el Plan Nacional de Contingencia contra derrame de hidrocarburos, derivados y sustancias nocivas”, firmado por el Presidente de la República y por los ministros del Interior, del Medio

Ambiente, de Defensa Nacional, de Desarrollo Económico, de Minas y Energía y de Transporte.

- **Resolución 0222 Del 15 De Diciembre Del 2011** que les exige una solución a mediano plazo para la eliminación de equipos y aceites contaminados con PCBs.

3. MARCO TEÓRICO

Biodegradación de PCB's

Actualmente, diversas metodologías desarrolladas en laboratorios para el tratamiento de PCB's y matrices contaminadas con PCB's, principalmente métodos físicos y químicos. Entre los métodos químicos y físicos se encuentran el uso de voltaje de vacío térmico (VCR por sus siglas en inglés) [36], la aceleración de rayos de electrones [37] [38] y la oxidación supercrítica de agua [39]. Asimismo, los microorganismos pueden modificar los contaminantes orgánicos tales como PCB's, de tal manera que los efectos negativos se reducen al mínimo. Los microorganismos participan en la biodegradación mediante la producción de enzimas que modifican el contaminante orgánico en compuestos más simples. La biodegradación puede ser de dos formas, por mineralización y co-metabolismo [40]. En la mineralización, organismos competentes utilizan el contaminante orgánico como fuente de carbono y energía que resulta en la reducción del contaminante a sus elementos constitutivos. El co-metabolismo, por otro lado, requiere una segunda sustancia, tal como una fuente de carbono y energía para los microorganismos, pero el contaminante objetivo se transforma al mismo tiempo. Si los productos de co-metabolismo son susceptibles a una mayor degradación puede alcanzarse la mineralización, de otro modo la degradación sería incompleta. Esto puede resultar en la formación y acumulación de metabolitos que son más tóxicos que la molécula parental que requiere un consorcio de microorganismos, que pueden utilizar la nueva sustancia como fuente de nutrientes [41] [42].

Rutas de biodegradación de PCBs.

Degradación anaerobia de PCB's - Declorinación Reductiva

La transformación anaerobia de compuestos orgánicos clorados implica deshalogenación reductiva en donde el compuesto orgánico halogenado sirve como aceptor de electrones, el átomo de halógeno se sustituye con hidrógeno. Los aceptores de electrones son generalmente los factores que limitan el metabolismo en ambientes anaeróbicos. Por lo

tanto, cualquier microorganismo que pudiera usar los PCB como aceptores terminales de electrones sería una ventaja selectiva [11].

La dechloración anaeróbica puede degradar a una gran variedad de hidrocarburos alifáticos clorados e hidrocarburos aromáticos. Varias bacterias anaerobias dechloradoras han sido aisladas, entre las que se incluyen *Desulfomonile tiedjei*, *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter restrictus*, *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfomonas chloroethenica*, *Dehalococcoides ethenogenes* y anaerobios facultativos como *Enterobacter* cepa MS-1 y *Enterobacter agglomerans*. Algunos de estos microorganismos eliminan reductivamente el cloro del compuesto clorado en una reacción de co-metabolismo, mientras que otros utilizan los compuestos clorados como aceptores de electrones en el metabolismo de obtención de energía. Las características comunes a dehalogenadores son: (a) la deshalogenación reductora del arilo es catalizada por enzimas inducibles, (b) estas enzimas presentan distinta especificidad por el sustrato, (c) la función arilo dehalogenadora en las comunidades sintróficas puede depender de tales comunidades y, (d) los microorganismos arilo dehalogenadores derivan energía metabólica de la deshalogenación reductora [11].

La dechlorinación se espera que reduzca la toxicidad de los PCB's y además también hacerlos aerobicamente más degradables. La deshalogenación de los PCB's fue reportada inicialmente en los sedimentos del río Hudson. La evidencia demuestra que la dechloración de PCB's está ampliamente distribuida en ambientes anaerobios, incluyendo sistemas de agua dulce (estanques, lagos y ríos), estuarinos y sedimentos marinos [43] [44].

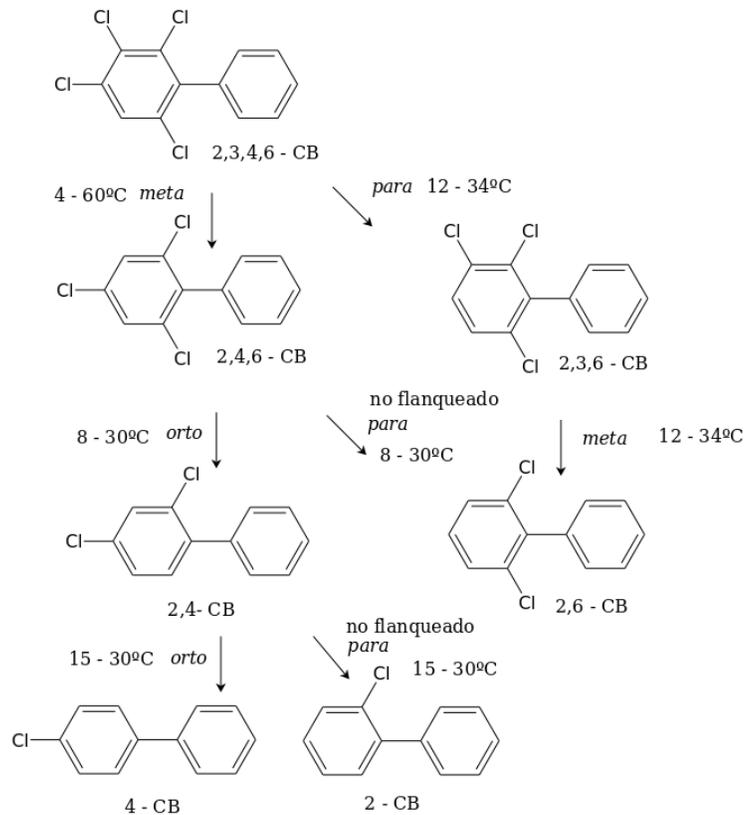
La especificidad de la dechloración microbiana varía ampliamente, los cambios composicionales fueron demostrados en el laboratorio utilizando microorganismos de sedimentos de río y lago. Hay patrones específicos de dechloración en términos de selectividad de los congéneres y reactividad de los clorofenilos. Relativos a la composición original de Aroclor, los perfiles de distribución de congéneres de PCB en los sedimentos fueron caracterizados por (a) una mayor proporción de congéneres mono y diclorados (b) una alta proporción de cloros en posición orto, y (c) disminución selectiva de tri hasta pentaclorobifenilos. La deshalogenación reductiva fue observada desde

Aroclor 1242, 1248, 1254 y 1260. A la concentración probada (700 mg/kg), 53% del cloro total había sido removido, pero solo de las posiciones *meta* y *para*, y la proporción de mono y diclorobifenilos se incrementó de un 9% a un 88%. La declorinación de PCB's mediada microbiológicamente, típicamente remueve cloros en posición *meta* y/o *para* para generar principalmente sustitutos *orto*, a partir de tetraclorobifenilos [45].

Se han descrito varias rutas de declorinación de PCB's, tanto para muestras ambientales como para muestras de laboratorio [46] [47] [48]. Hay por lo menos ocho diferentes procesos de declorinación (procesos M, Q, HP, H, P, N, LP y T), las cuales pueden ser identificadas a través de cuidadosas comparaciones de los patrones de la desaparición de congéneres y formación de productos [44] [49] [50] [51]. Los procesos M y N remueven exclusivamente cloros en posición *meta*, y el proceso P, exclusivamente cloros en posición *para*. Solo los procesos Q y M pueden remover cloros no flanqueados como aquellos en el anillo del 3- ó 2,5 clorofenilo (proceso M) o el anillo de 4- ó 2,4 clorofenil (proceso Q). Entre los procesos de declorinación, la habilidad de remover cloros *meta* y *para* de posiciones flanqueadas es más común. Los procesos H, N y P preferiblemente declorinan sustitutos más fuertemente clorados que los procesos Q y M. Por lo tanto, al menos cinco factores mayoritarios pueden ser considerados para determinar el alcance y la ruta de declorinación: (a) la población microbiana presente, (b) la posición (*orto*, *meta* o *para*) de los cloros, (c) la configuración de los cloros circundantes, (d) la configuración de los cloros del anillo opuesto y (e) las condiciones de incubación.

También se ha reportado declorinación en la posición *orto* en varios congéneres individuales de PCB (ej. 2,4-CB, 2,4,6-CB and 2,3,5,6-CB) [52] [53] [54]. Como un ejemplo de las distintas rutas de deshalogenación de un congénere bajo condiciones anaeróbicas, la ilustración 2 describe las diferentes rutas observadas para los CB - 2, 3, 4, 6 en muestras de sedimentos de un estanque en el bosque del río Housatonic (MA, USA).

Ilustración 2. Rutas de declorinación reductiva microbiana



Fuente: *Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls*. Wiegel, Juergen y Wu, Qingzhong . 2000 [55].

Degradación aerobia de PCB's – Metabolismo oxidativo

La degradación bacteriana aerobia de compuestos aromáticos ocurre generalmente en dos etapas, las cuales está referidas comúnmente como vías superiores e inferiores. Las vías superiores se caracterizan por la desestabilización del compuesto aromático, mientras que las vías inferiores convierten los productos desestabilizados en intermediarios del ciclo de Krebs como acetil-CoA. Las rutas superiores generalmente producen intermediarios aromáticos dihidroxilados como protocatecuato, catecol o gentsitato. Estos intermediarios centrales son subsecuentemente convertidos en intermediarios del ciclo de Krebs por medio de las rutas inferiores, como la ruta de *orto*-ruptura, la ruta de la *meta*-ruptura o la ruta del gentsitato [56] [57].

La biotransformación aerobia de PCB's es lograda utilizando la ruta catabólica de los bifenilos [58] [59] (Ilustración 3). La reacción inicial es catalizada por la bifenildioxigenasa (BPDO), una enzima multicomponente consistente de una reductasa que contiene FAD (BphG), una Ferredoxina tipo Rieske (BphF) y una oxigenasa con dos componentes (BphAE). BphG y BphF transfieren electrones desde el NADH a la BphAE, la cual transforma el bifenilo a cis-(2R, 3S)-dihidrodi-hidroxi-1-fenilhexa-4,6-dieno. El dihidrodiol es subsecuentemente oxidado y luego roto vía las actividades sucesivas de la dihidrodi-hidroxi-bifenil deshidrogenasa (BphB) y la 2,3-dihidroxi-bifenil dioxigenasa (BphC). El producto de la ruptura del anillo es hidroxilado a benzoato y ácido 2-hidroxi-2,4-dienoico vía la hidrolasa BphD. Las rutas inferiores, las cuales incluyen hidratasas, aldolasas y deshidrogenasas, transforman el ácido 2-hidroxi-2,4-dienoico a intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Mientras, que el benzoato es catabolizado a catecol antes de ser transformado a intermediarios del ciclo de Krebs [59] [58] [60].

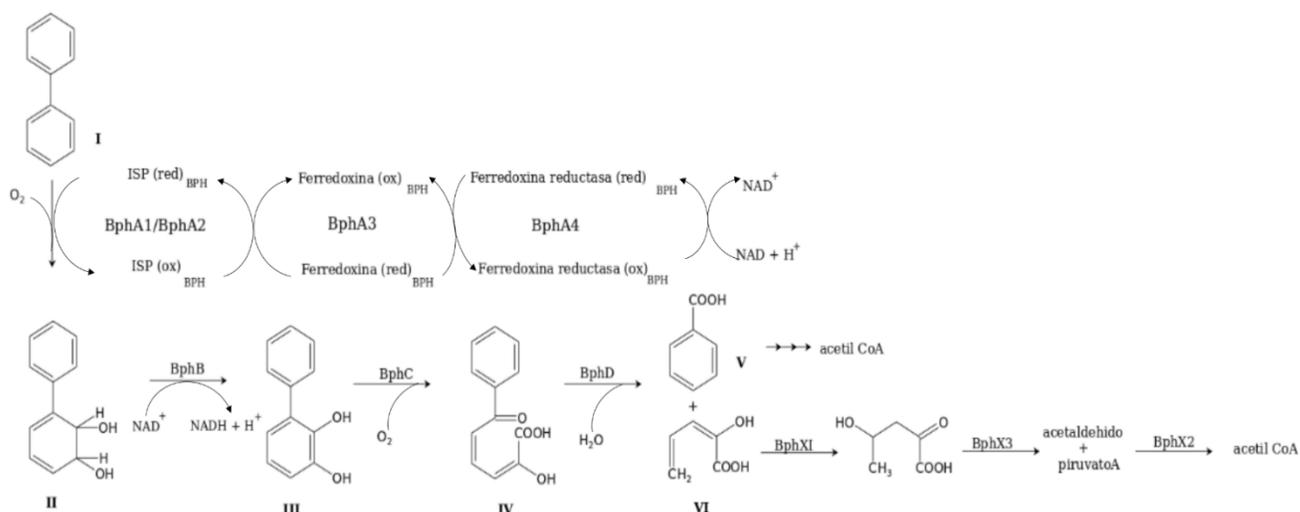
Las bacterias que aerobíamente degradan PCB's incluye a miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus*; mientras que el bifenilo y monoclorobifenilo pueden servir como sustratos para el crecimiento, la degradación de los congéneres de PCB con más de un átomo de cloro ocurre por un proceso de co-metabolismo en la que el bifenilo se utiliza como fuente de carbono y energía mientras se oxida el PCB [61]. En general, PCB's menos clorados son biodegradados de forma más sencilla que los más clorados, y el anillo de bifenilo menos clorado es preferencialmente transformado [56].

El bifenilo también sirve como un inductor de las enzimas de degradación. Se ha reportado que especies de *Achromobacter*, *Nocardia* sp. y *Pseudomonas* sp. aumentaron la degradación de PCB's tras la adición de bifenilo [11]. Clark y colaboradores, describen un mayor co-metabolismo de Aroclor 1242 en presencia de acetato utilizando cultivos mixtos de *Alcaligenes odorans*, *A. denitrificans*, y una bacteria no identificada [62]. Estos microorganismos también co-metabolizaban Aroclor 1254 en presencia de bifenilo. La oxidación observada de PCB's con la presencia de un segundo sustrato, se atribuyó a la mayor biomasa que adiciona una ligera oxidación por cada microorganismo dando lugar a una degradación más completa de los PCB's.

La voluminosidad de los átomos de cloro impide el acceso al sitio activo de la enzima. Por otra parte, los átomos de cloro pueden prevenir la oxigenación si ocupan las posiciones de los carbonos que son más susceptibles al ataque oxigenasa [63]. Las posiciones *orto* también son los más resistentes al ataque microbiano [64].

Algunas bacterias aeróbicas tienen la capacidad de degradar los congéneres de PCB altamente clorados utilizando una reacción oxigenasa inicial diferente que implica un 3,4-hidroxilación en lugar de 2,3-hidroxilación. Este es el caso de *P. putida* LB400 y *P. testosteronii* B356. En *P. testosteronii*, el ataque oxigenasa estaba siempre en el carbono *orto*-y *meta*, mientras que para *P. putida*, el ataque oxigenasa de congéneres de PCB con átomos de cloro en ambos anillos se suele ir acompañado de una deshalogenación en *para*-u *orto* de la molécula [11].

Ilustración 3. Ruta catabólica de los Bifenilos y biodegradación de PCBs



Fuente: K. Furukawa y H. Fujihara, «*Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls: Biochemical and Molecular Features*,».2008. [60]

Biodegradación de PCB's por hongos

Los hongos pueden rápidamente oxidar y mineralizar un amplio espectro de diversos compuestos aromáticos, incluyendo los PCB's, sin embargo, la transformación de los PCB's por los hongo puede verse limitada por su biodisponibilidad [65].

El género *Pleurotus* incluye especies comestibles y medicinales que pertenecen al grupo de los hongos de la podredumbre blanca, nombrados así debido a su habilidad de producir enzimas lignolíticas extracelulares: lacasa (Lac), dos peroxidases (peroxidasa dependiente de Mn y peroxidasa versátil) y la aril-alcohol oxidasa (AAO); que modifican y degradan la lignina [66].

Ha sido demostrada la capacidad de especies *Pleurotus* de degradar diferentes congéneres de PCB's mediante el uso de los sistemas enzimáticos que presentan. En suelos contaminados con una mezcla comercial de PCB (Delor 103) se evidenció que *Pleurotus ostreatus* fue capaz de remover alrededor del 40% del PCB en dos meses, con preferencia por los congéneres con átomos de cloro en posiciones *orto* > *meta* > *para*, y la eficiencia de la degradación disminuye con el incremento del número de cloros [67]. A su vez, en sistemas líquidos con medio mineral se evidencia que *P. ostreatus* es capaz de remover entre el 98.4% y 99.6% de Delor 103, siendo capaz de desdoblar penta e hexaclorobifenilos en el sistema de estudio [68].

Consortios microbianos

El uso de consorcios de microorganismos para efectuar la degradación de diferentes hidrocarburos ha sido demostrado en diversos trabajos, en los cuales la actividad degradadora fue más alta cuando diferentes cepas eran utilizadas en conjunto, en comparación con la actividad de cada cepa frente al contaminante de forma individual. Carvalho y Alves 2002, han demostrado la degradación de fluorobenceno mediante el uso de un consorcio bacteriano, en el cual tres cepas recuperadas del consorcio enriquecido eran esenciales para completar la mineralización del fluorobenceno [69]. A su vez Adrian y colaboradores 1998, utilizaron un consorcio de bacterias para la degradación de 1,2,3- y 1,2,4-Triclorobenceno, el consorcio de microorganismos fue capaz de declorinar reductivamente los congéneres de triclorobencenos [70]. En cuanto a la degradación de PCB's utilizando consorcios microbianos Romero y colaboradores 2006 [71], demostraron que la degradación de 2,4-diclorobifenil; 2,3',4- triclorobifenil y 2,4',5-triclorobifenil fue realizada de forma más eficiente mediante el uso de las levaduras *Debaryomyces castelli*, *Debaryomyces maramus* y *Dipodascus aggregatus* cuando fueron adicionadas en conjunto, que la actividad degradadora de cada una por separado.

Durante el metabolismo de los PCB's, los clorobenzoatos formados tienden a acumularse en la mezcla de reacción junto con otros metabolitos intermedios, tales como dihidroxi y trihidroxi compuestos y otros productos no identificados. Los cultivos capaces de co-metabolizar PCB's suelen ser incapaces de crecer en estos sustratos [41]. Esto sugiere que ningún organismo individual es responsable de la degradación de múltiples bifenilos clorados. Trabajos anteriores han demostrado que una degradación más eficiente de los bifenilos monoclorados por parte de consorcios de bacterias, se produce en la presencia de una cepa capaz de degradar clorobenzoatos producidos por los miembros de la degradación de PCB, ya sea directamente o por la co-metabolismo [11] [72] [73]. La incorporación de microorganismos degradadores clorobenzoato tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* puede afectar en gran medida la mineralización completa de los PCB's. También es necesario un consorcio microbiano mixto para sinergismo microbiana y Sinergismo co-metabolismo también es importante en la mejora de la tasa global de la degradación de los PCB en cultivos mixtos. Este aumento de la frecuencia es el resultado de ataque metabólico combinado en diferentes sitios en el compuesto orgánico, aumentando la tasa de degradación global [57].

4. METODOLOGÍA

La metodología desarrollada en este proyecto, constó de 12 etapas descritas a continuación:

Etapa 1. Obtención y caracterización del aceite dieléctrico

Se utilizó una muestra de aceite dieléctrico de transformador de un volumen de 2 L, la cual fue donada por una empresa regional del sector eléctrico. Se le determinó la concentración de PCB's, lo cual fue realizado por el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander (UIS) de acuerdo al método ASTM D-4059-00, a fin de poder realizar los cálculos de ajuste de concentración de PCB's para los ensayos y determinaciones que fueron llevadas a cabo durante el desarrollo del proyecto.

Etapa 2. Esterilización del aceite dieléctrico de transformador

El aceite dieléctrico se esterilizó utilizando un sistema de filtración desechable de millipore usado normalmente para filtrar líquidos poco viscosos, el sistema de filtración fue de un tamaño de poro de 0.22 μm , lo cual permitió eliminar cualquier tipo de bacteria u hongo que estuviera presente en el aceite dieléctrico. Cabe resaltar que el aceite dieléctrico no debe ser esterilizado con calor, debido a que el contenido de PCB's en la muestra puede incurrir en la producción de subproductos peligrosos para la salud y el medio ambiente.

El volumen filtrado fue de alrededor de 150 mL de aceite dieléctrico, el cual posteriormente fue utilizado para los ensayos de degradación.

Para comprobar la esterilidad del aceite, fueron sembrados 3.38 mL de aceite dieléctrico en 150 mL de medio mínimo mineral y puesto en incubación durante 3 semanas a 35°C, transcurrido el tiempo de incubación fue transferido 1 mL de medio con aceite a una caja de Petri con agar nutritivo y e incubado en las mismas condiciones por 48 horas.

Etapa 3. Obtención y activación de consorcios

Los consorcios utilizados pertenecen al cepario de la Universidad Libre Seccional Barranquilla, los cuales fueron aislados de suelos contaminados con PCB's en medios de cultivo con bifenilo, que demostraron tolerancia en concentraciones de hasta 200 ppm y se han desarrollado en medios que contienen PCB's como única fuente de carbono [74] [75] [76] [77]; estas cepas que fueron utilizadas en los ensayos de biodegradación corresponden a cepas de bacterias aerobias y bacterias anaerobias y hongos.

Los consorcios de bacterias aerobias fueron reactivadas en caldo nutritivo e incubadas a 35°C hasta ser observado crecimiento. Las bacterias anaerobias fueron reactivadas en caldo tioglicolato e incubadas en campana de anaerobiosis a 35°C hasta ser observado crecimiento. Los hongos fueron reactivados en caldo extracto de malta e incubados a 25 °C hasta ser observado crecimientos.

Etapa 4. Purificación y aislamiento de cepas de los consorcios

Cada uno de los consorcios reactivados fue sometido a purificación de los microorganismos presentes. A continuación se describe el procedimiento de purificación y aislamiento llevado a cabo mediante repiques en medios de cultivo sólidos con aceite dieléctrico a una concentración final de PCB a 100 ppm:

- Los consorcios de bacterias aerobias fueron sembrados en agar nutritivo marca MERK, preparado según las instrucciones del fabricante, e incubados a una temperatura de 35°C hasta que fue observado crecimiento.
- Los consorcios de bacterias anaerobias fueron sembrados en caldo tioglicolato marca OXOID preparado según las instrucciones del fabricante y adicionado con 15% de agar - agar, en campana de anaerobiosis con un sistema Anaerocult marca MERK a 35°C hasta observar crecimiento.
- Los consorcios de hongos fueron repicados en agar sabouraud marca MERK, preparado según las instrucciones del fabricante e incubados a una temperatura de 28°C hasta observar crecimiento.

A las colonias aisladas de bacterias les fue realizada tinción de gram y observación macroscópica de la morfología. A las colonias de hongos obtenidas les fue realizada observación de la morfología macroscópica y microscópica.

Etapa 5. Curvas de crecimiento de bacterias de los consorcios

Se realizaron las curvas de crecimiento de las bacterias aerobias que se purificaron, cepas que fueron escogidos para los ensayos de degradación fueron denominadas C1, C4(2), C7 y C10, debido a que eran las morfologías que agrupaban al resto.

El montaje de las curvas de crecimiento se realizó tomando una asada de una colonia de cada una de las cepas y se adición en 60 mL de caldo nutritivo y dejando en incubación por 24 horas a 35 °C. Luego la densidad óptica de cada uno de los cultivos fue medida y ajustada en un espectrofotómetro Fisher Scientific Modelo EVOLUTION 60S PC a 0.05 a 600 nm, mediante el uso de la fórmula $DO1 \cdot V1 = DO2 \cdot V2$. Luego de ajustada la densidad óptica, los cultivos fueron puestos en incubación en agitación constante a 100 rpm realizando monitoreo del crecimiento cada hora.

Cada una de las cepas fue montada por duplicado y además se utilizó un blanco estéril como control.

Etapa 6. Obtención de biomasa bacteriana

La obtención de la biomasa de las cepas de bacterias tanto aerobias como anaerobias se realizó mediante la incubación de las bacterias en 40 mL de caldo nutritivo marca MERK para las bacterias aerobias y caldo tioglicolato marca OXOID para las bacterias anaerobias e incubadas hasta el inicio de la fase estacionaria, momento en el cual las células se recolectaron mediante centrifugación a 2500 rpm durante 45 minutos y posteriormente se resuspendieron en buffer PBS para ser utilizadas en los ensayos de degradación.

Etapas 7. Preparación de suspensión de esporas.

Se preparó una suspensión de esporas de los mohos obtenidos de los aislamientos de las cepas de aceite dieléctrico y de los consorcios de microorganismos. La suspensión de esporas se realizó mediante la siembra de los hongos en agar sabouraud hasta que la colonia presentara crecimiento suficiente. Luego se adicionó sobre la colonia del moho 15 mL de solución salina estéril al 0.85% y se removieron las esporas con un asa en aro para generar una solución del micelio y esporas del moho. Posteriormente el líquido fue recogido con una pipeta estéril y filtrado con una gaza estéril para remover el micelio y dejar solo las esporas del moho para su posterior almacenamiento en un frasco estéril.

Etapas 8. Montaje de los ensayos de biodegradación

Los ensayos de degradación fueron realizados en medio mínimo mineral (MMM), ajustando la concentración final de PCB a 200 ppm y adicionados con Tween 80 como surfactante para aumentar la biodisponibilidad del contaminante.

La composición del medio mínimo mineral es (g/L) K_2HPO_4 56.77, KH_2PO_4 21.94, NH_4Cl 27.61, $MgSO_4$ 19.5, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 5.0, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 y $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.3, junto con la adición de varias gotas de H_2SO_4 concentrado para prevenir la precipitación de las sales básicas [63]; además fue adicionado aceite dieléctrico estéril contaminado con PCB, ajustando la concentración final del contaminante a 250 ppm, asimismo se adicionó 0.3 μL de Tween 20 por cada 1 μL de aceite dieléctrico añadido al medio de cultivo como surfactante para aumentar la biodisponibilidad del PCB. Los experimentos se llevaron a cabo en frascos de vidrio con un volumen total de 750 mL y un volumen de trabajo de 700 mL.

Cada uno de los ensayos de biodegradación fue desarrollado por duplicado y con un control abiótico, al cual no se adicionó inóculo de microorganismos degradadores, los tratamientos realizados se describen a continuación:

- Ensayo de cepas bacterianas aerobias
 - Con Acetato al 1%

- Sin fuente de carbono adicional
- Ensayo de cepas bacterianas anaerobias
 - Con Acetato al 1%
 - Sin fuente de carbono adicional
- Ensayo de cepas de hongos
 - Con Glucosa al 1%
 - Sin fuente de carbono adicional
- Ensayo mixto (bacterias anaerobias/bacterias aerobias)
 - Con Acetato al 1%
 - Sin fuente de carbono adicional
- Control abiótico.

Cada uno de los ensayos fue realizado por duplicado y de igual forma el control abiótico. Para la adición de las bacterias aerobias y anaerobias, el inóculo de cada microorganismo fue ajustado en un espectrofotómetro Fisher Scientific Modelo EVOLUTION 60S PC a una densidad óptica de 0.5 de absorbancia en una cubeta de vidrio de 1 cm de paso de luz, y adicionado 1 mL de cada cultivo al ensayo correspondiente. Para los tratamientos con hongos fueron adicionados a cada frasco 1 mL de las suspensiones de esporas previamente preparadas. El ensayo mixto inició con la adición de las bacterias anaerobias hasta el día 9, momento en el cual fue realizada la transición a aerobiosis y se realizó la adición de 1 mL de los inóculos de las bacterias aerobias.

Los ensayos anaerobios y mixto fueron inyectados con una mezcla de N_2 y CO_2 en proporción de 80/20 para generar una atmósfera anaerobia apropiada para el crecimiento de los microorganismos [78] [79].

Todos los tratamientos fueron incubados a temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C). Se realizó el monitoreo de las variables pH, temperatura, cantidad de biomasa

degradadora, las cuales serán medidas los días 0, 3, 6, 9, 13, y 20. La variable concentración de PCB fue determinada los días 0, 9 y 20 de los experimentos.

Etapa 9. Determinación de microorganismos degradadores

La cantidad de microorganismos degradadores se evaluó mediante recuentos en placa en agar nutritivo para bacterias aerobias, agar sabouraud para hongos y tioglicolato para bacterias anaerobias, adicionados con una concentración de PCB's de 100 ppm. Las cajas de agar se inocularon con 1 mL de muestra de los ensayos, realizando una siembra en profundidad. Las cajas con agar son incubadas a 35°C por 48 horas para bacterias aerobias y anaerobias y temperatura ambiente para los hongos. La lectura de los resultados se realizó mediante recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) [9].

Etapa 10. Medición de pH y temperatura de los ensayos de biodegradación

La medición de pH y temperatura a cada una de las réplicas de los ensayos de biodegradación, se realizó con un potenciómetro HANNA HI8424N. Se tomó una alícuota de 10 mL en un beaker con capacidad para 25 mL y se sumerjió el electrodo a una profundidad de 4 cm, agitándolo brevemente hasta la lectura del equipo se estabilizara.

Etapa 11. Extracción de las muestras y análisis cromatográfico

La determinación de la concentración de PCB en los ensayos fue realizado por el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander (UIS). La preparación de las muestras acuosas se realizó con base en el método EPA 3520C, empleando diclorometano como solvente de extracción.

El análisis de las muestras se desarrolló según la norma para la determinación de PCB en aceites dieléctricos ASTM D-4059-00 empleando como material de referencia las mezclas certificadas de Arocloros 1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254, 1260 en *n*-hexano. Se realizó en un cromatógrafo de gases HP 5890 series II (Hewlett Packard, Palo Alto California, EE.UU.) dotado con un detector de captura de electrones (EDC). La columna

empleada es DB-5 (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) [5% - fenil-poli (metilsiloxano), 30m x 0.25mm x 0.25µm]. La inyección se realizó en modo splitless ($V_{iny}= 2\mu\text{L}$).

Etapa 12. Análisis de datos

Los datos recolectados les fue realizado un análisis de estadística descriptiva, de medidas de tendencia central y medidas dispersión, como promedio, desviación estándar y error estándar de la media. De igual forma, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para identificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados y un Post Test de Dunnett con la finalidad de evidenciar cual de los tratamientos era significativamente inferior al tratamiento control. Asimismo, fue realizada una prueba T de Student para comparar cada grupo de microorganismo evaluado entre los tratamientos con una fuente adicional de carbono y aceite dieléctrico como única fuente de carbono.

Por otra parte, fueron evaluados parámetros de desempeño del proceso de degradación, como porcentaje de degradación, porcentaje de PCB residual, velocidad específica de crecimiento, velocidad máxima de crecimiento, tiempo de duplicación y constante de Monod para cada uno de los ensayos de acuerdo a las fórmulas descritas a continuación:

Ecuación 1. Porcentaje de degradación

$$\% \text{ degradación} = 1 - \left(\frac{[\text{PCB final}]}{[\text{PCB inicial}]} \right) \times 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de PCB residual

$$\% \text{ PCB residual} = \frac{[\text{PCB final}]}{[\text{PCB inicial}]} \times 100$$

Ecuación 3. Velocidad específica de crecimiento

$$\mu = \frac{\text{Ln } X_2 - \text{Ln } X_1}{t_1 - t_2}$$

Ecuación 4. Tiempo de duplicación

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ecuación 5. Constante de Monod

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu m} \left(\frac{1}{S_r} \right) + \frac{1}{\mu m}$$

Se utilizaron para el análisis de los datos la hoja de cálculo Microsoft Excel 2011 y los software estadísticos Statgraphics Centurion XV y Minitab 16.

5. RESULTADOS

Caracterización del aceite dieléctrico de transformador.

El aceite dieléctrico presentó una concentración de PCB's de 8814 ppm, de acuerdo a los resultados de la Universidad Industrial de Santander (UIS) (Anexo 1)

Aislamientos de microorganismos de la flora endógena de aceite dieléctrico

Las siembras de microorganismos endógenos del aceite dieléctrico permitió el aislamiento de dos mohos, los cuales de acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos se asignan como *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* (Anexo 2)

Purificación e identificación de microorganismos de consorcios

Al realizar la reactivación de los consorcios preservados se presentó que no todos los consorcios presentaron crecimiento, la tabla 4 describe cuales presentaron crecimiento.

Tabla 4. Reactivación y purificación de consorcios reactivados

Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Hongos
Consortio 1 +	Consortio 1 +	Consortio 3 +
Consortio 2 +	Consortio 2 +	Consortio 4 +
Consortio 3 +	Consortio 4 +	Consortio 5 +
Consortio 4 +	Consortio 5 +	Consortio 6 +
Consortio 5 +	Consortio 6 +	Consortio 7 +
Consortio 6 +	Consortio 7 +	Consortio 9 +
Consortio 7 +	Consortio 8 +	Consortio 10 +
Consortio 8 +	Consortio 9 -	Consortio 11 +
Consortio 9 +	Consortio 10 +	Consortio 12 +
Consortio 10 -	Consortio 11 +	Consortio 13 +
Consortio 11 +		

+ (Crecimiento) ; - (Sin crecimiento)

Tabla 5. Resultados de observación microscópica de bacterias aerobias y anaerobias aisladas

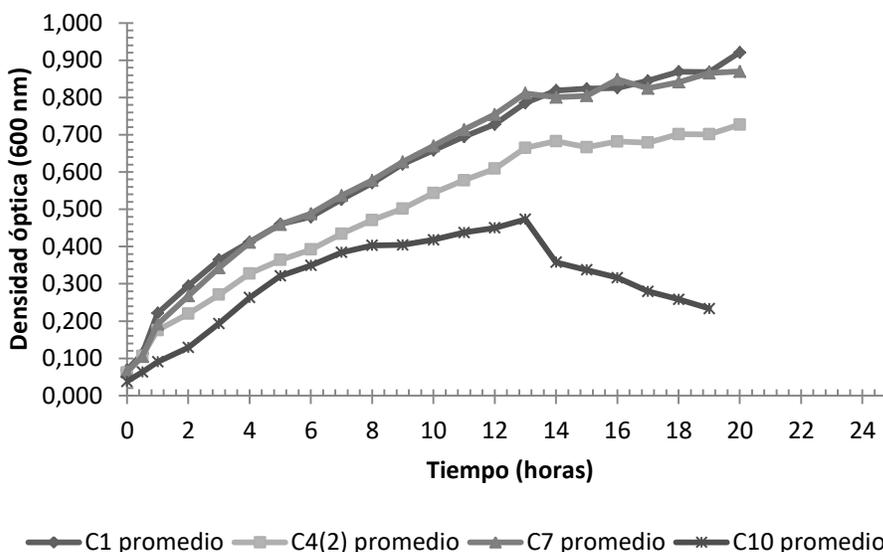
Bacterias aerobias			Bacterias anaerobias		
Consortio	Descripción microscópica	Descripción macroscópica	Consortio	Descripción microscópica	Descripción macroscópica
1	Bacilos gram +, con células esporuladas	Colonias cremosas de borde redondeado liso	1	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
2	Bacilos gram +, algunas células esporuladas	Colonias cremosas de borde redondeado liso	2	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
3	Bacilos gram +, con células esporuladas	Colonias cremosas de borde redondeado liso	4	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
4 colonia 1	Bacilos gram +, algunas células esporuladas	Colonias secas umbilicada	5	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
4 colonia 2	Bacilos gram +, algunas células esporuladas	Colonias cremosa de borde liso	6	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
5	Bacilos gram +, algunas células esporuladas,	Colonias secas umbilicada	7	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
6	Bacilos gram +, algunas células esporuladas,	Colonia seca de borde irregular	8	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
7	Cocos gram +, no se encuentra formando cadenas u otro tipo de agrupaciones	Colonia cremosa de borde liso	9	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
8	Bacilos gram +, algunas células esporuladas,	Colonias secas umbilicada	10	Bacilos gram + esporulados	Colonias cremosas pequeñas
9	Bacilos gram +, algunas células esporuladas,	Colonias secas umbilicada	11	Bacilos gram + esporulados y cocos gram +	Colonias cremosas pequeñas
10	Bacilos gram +, algunas células esporuladas,	Colonias secas umbilicada			

Luego del procedimiento de reactivación se sucedió al proceso de aislamiento y purificación de los microorganismos obtenidos de cada consorcio. Se realizó una tinción de gram a las cajas que presentaron crecimiento, para observar las morfologías a nivel microscópico de cada una de las bacterias, no obstante, debido a que se dio crecimiento mixto de algunos cultivos, fueron repicados en siembras por agotamiento en los mismos medios de cultivo descritos anteriormente e incubados en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos de la observación microscópica se describen en la Tabla 5. Con base en los resultados de las tinciones se concluyó que realmente existen dos géneros predominantes en las bacterias, los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Anexo 3), ambos reportados como degradadores de PCB's.

Resultados curvas de crecimiento bacteriano

Las bacterias utilizadas para los ensayos de degradación presentaron curvas de crecimiento en las cuales los tiempos de ingreso a fase estacionaria para fueron de 13 horas para las bacterias identificadas como C1, C4(2) y C7, la C10 presentó un tiempo de 7 horas para el ingreso a la fase estacionaria (Ilustración 4).

Ilustración 4. Curvas de crecimiento de bacterias aisladas



Resultados ensayos de degradación de PCB

Los resultados de los ensayos de degradación arrojan valores finales de concentración de PCB que oscilan entre 218.5 mg/kg y 42.0 mg/kg (tabla 6) (Anexo 4), así como valores relativos de reducción de la cantidad de PCB que se encuentran entre -17.52% y 77.62%, alcanzando reducciones superiores al 50% en 4 de los 8 ensayos realizados (tabla 7, ilustración 5). Asimismo, los tratamientos de bacterias aerobias con acetato y hongos presentaron los mayores valores porcentuales de reducción de concentración de PCB, con 75.99% y 77.62% respectivamente. Sin embargo, al comparar las concentraciones iniciales promedio de ambos tratamientos, se observa que es mayor la concentración inicial de PCB en el tratamiento de hongos en comparación con el tratamiento de bacterias aerobias con acetato, por lo cual en proporción el tratamiento con hongos redujo la concentración de PCB 5.5 veces y el de bacterias aerobias 4 veces.

No obstante, al realizar el análisis de varianza ANOVA se evidenció la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P=0.005$). De este modo, al efectuar el post-test de Dunnett, se obtuvo como resultado que las concentraciones finales de los tratamientos de bacterias aerobias con acetato (-129.90 a -6.98) y hongos (-131.53 a -8.61) son significativamente inferiores al grupo control.

Tabla 6. Concentración de PCB por tratamiento evaluado

Ensayo	Concentración de PCB mg/kg					
	Día 0		Día 9		Día 20	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Bacterias aerobias	116.5	17.7	143.5	70.0	77.0	2.8
Bacterias aerobias acetato	168.5	54.4	78.5	21.9	42.0	22.6
Bacterias anaerobias	183.0	101.8	95.5	55.9	110.0	24.0
Bacterias anaerobias acetato	214.5	111.0	50.0	12.7	83.5	12.0
Hongos	390.0	188.1	66.0	15.6	71.0	25.5
Hongos glucosa	229.0	33.9	70.5	14.8	218.5	7.8
Mixto	231.0	7.1	106.0	2.8	72.0	0.0
Mixto acetato	119.5	26.2	86.0	21.2	138.0	8.5
Control	143.5	75.7	112.5	33.2	121.5	27.6

\bar{x} = Promedio; s= Desviación estándar

Ilustración 5. Porcentaje de degradación de PCB por tratamiento evaluado

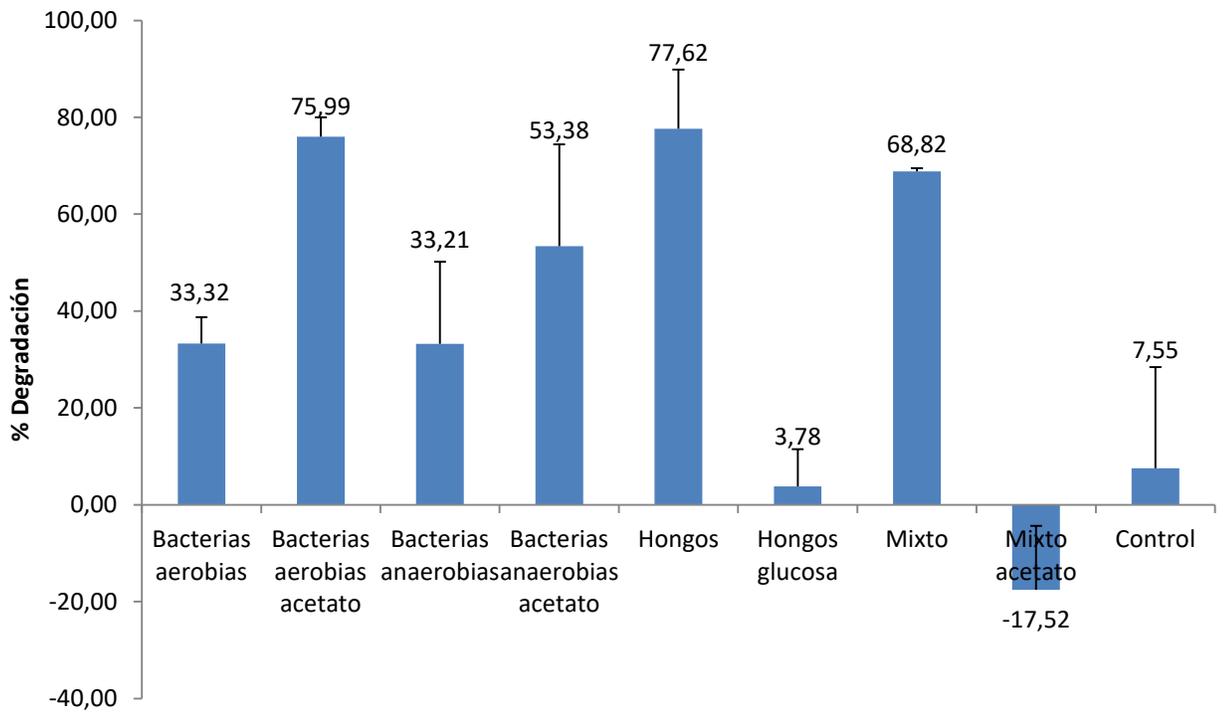


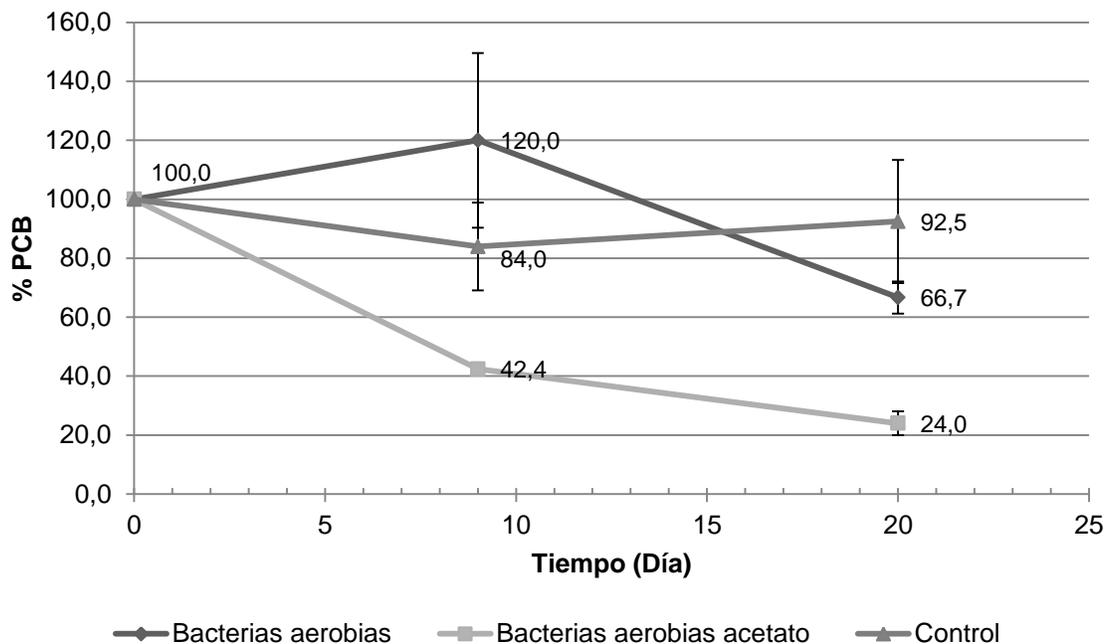
Tabla 7. Porcentaje de degradación y porcentaje de PCB residual por tratamiento

Ensayo	Porcentaje de degradación de PCB			Porcentaje de PCB residual			P 95%
	Día 0	Día 9	Día 20	Día 0	Día 9	Día 20	
Bacterias aerobias	0.00	-20.00	33.32	100.00	120.00	66.68	0.0241
Bacterias aerobias acetato	0.00	53.06	75.99	100.00	46.94	24.01	
Bacterias anaerobias	0.00	28.21	33.21	100.00	71.79	66.79	0.5333
Bacterias anaerobias acetato	0.00	74.86	53.38	100.00	25.14	46.62	
Hongos	0.00	79.76	77.62	100.00	20.24	22.38	0.0362
Hongos glucosa	0.00	68.39	3.78	100.00	31.61	96.22	
Mixto	0.00	54.07	68.82	100.00	45.93	31.18	0.0225
Mixto acetato	0.00	28.26	-17.52	100.00	71.74	117.52	
Control	0.00	1.86	7.55	100.00	98.14	92.45	-----

P 95%= Probabilidad con un nivel de confianza del 95%

Así, al realizar la comparación de los valores de porcentaje de PCB residual entre los tratamientos con una fuente adicional de carbono y sin ésta, se obtuvo como resultado diferencias significativas en los ensayos de bacterias aerobias ($P=0.0241$), hongos ($P=0.0362$) y mixto ($P=0.0225$) (tabla 7), Sin embargo, el único grupo de microorganismos evaluado que presentó una mayor reducción de la concentración de PCB con la adición de una fuente alternativa de carbono fue el de bacterias aerobias, en los tratamiento de hongos y mixto la presencia de otra fuente de carbono de fácil asimilación no repercutió en un aumento de la degradación de PCB.

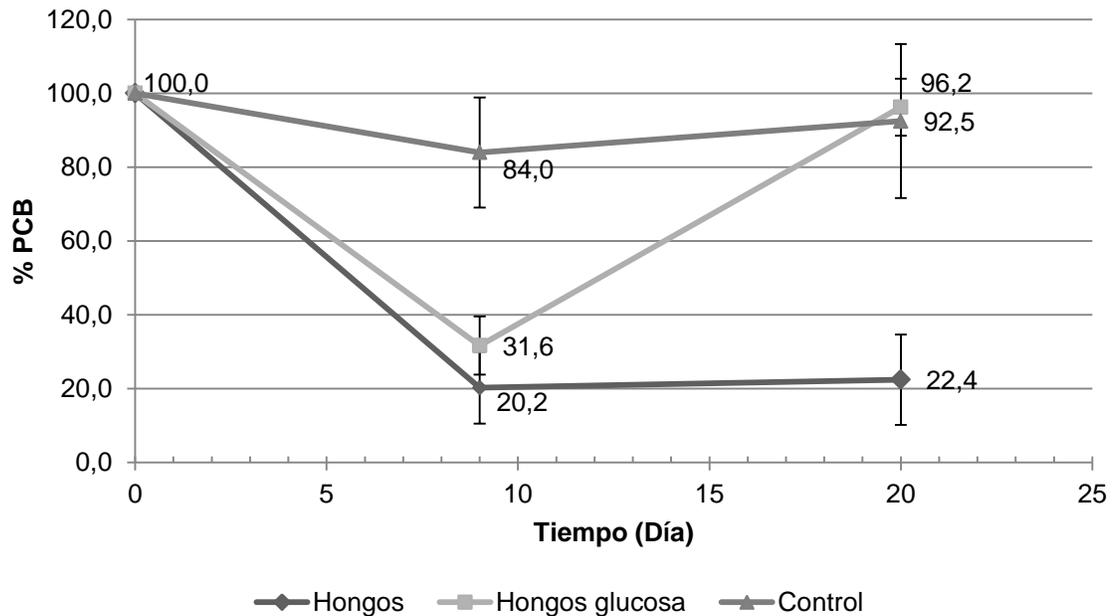
Ilustración 6. Degradación de PCB por consorcio de bacterias aerobias



De igual manera, al observar las curvas de degradación de PCB para los tratamientos de bacterias aerobias con acetato y hongos, se observa que a los 9 días han reducido la concentración de PCB a un 42.4% (ilustración 6) y 20.2% (ilustración 7) respectivamente y posterior a este tiempo la pendiente de la curva de degradación disminuye en lo que corresponde para el ensayo de bacterias aerobias y se estanca completamente el proceso de degradación en el ensayo de hongos. Con respecto a la curva de ensayo de hongos más glucosa, se evidencia inicialmente al día 9 una disminución muy similar al ensayo de

hongos sin glucosa, no obstante, al día 20 se da un aumento de la concentración de PCB hasta un 96.2%, no siendo eficiente este tratamiento para la degradación de PCB.

Ilustración 7. Degradación de PCB por consorcio de hongos



En cuanto los ensayos de degradación de bacterias anaerobias, las curvas muestran una reducción final hasta 66.8% y 46.6% de la concentración inicial para el tratamiento de bacterias anaerobias y bacterias anaerobias más acetato respectivamente, en donde se observa una mayor disminución del tratamiento con acetato, sin embargo no es estadísticamente diferente del tratamiento sin la fuente alternativa de carbono. De igual forma, el tratamiento con acetato presenta una reducción de la concentración de PCB a los 9 días hasta un 25.1%, pero posterior a esto se da nuevamente un aumento en el día 20 (ilustración 8).

Con respecto a los ensayos con consorcios mixtos de bacterias aerobias y anaerobias, al observar la curva de degradación (ilustración 9), se evidencia que en la fase inicial anaerobia hasta el día 9, hubo una disminución de la cantidad de PCB, posterior a esto en el tratamiento sin una fuente adicional de carbono se alcanza una reducción de la concentración de PCB hasta 31.2%, pero este valor no fue significativamente inferior al

tratamiento control. En cuanto al ensayo con adición de una fuente alternativa de carbono se observa que los resultados de la cuantificación de PCB arrojaron valores superiores en el día 20 en comparación día 0, con lo cual se evidencia que no se presentó la sinergia esperada entre los diferentes grupos de microorganismos para la degradación de PCB.

Ilustración 8. Degradación de PCB por consorcio de bacterias anaerobias

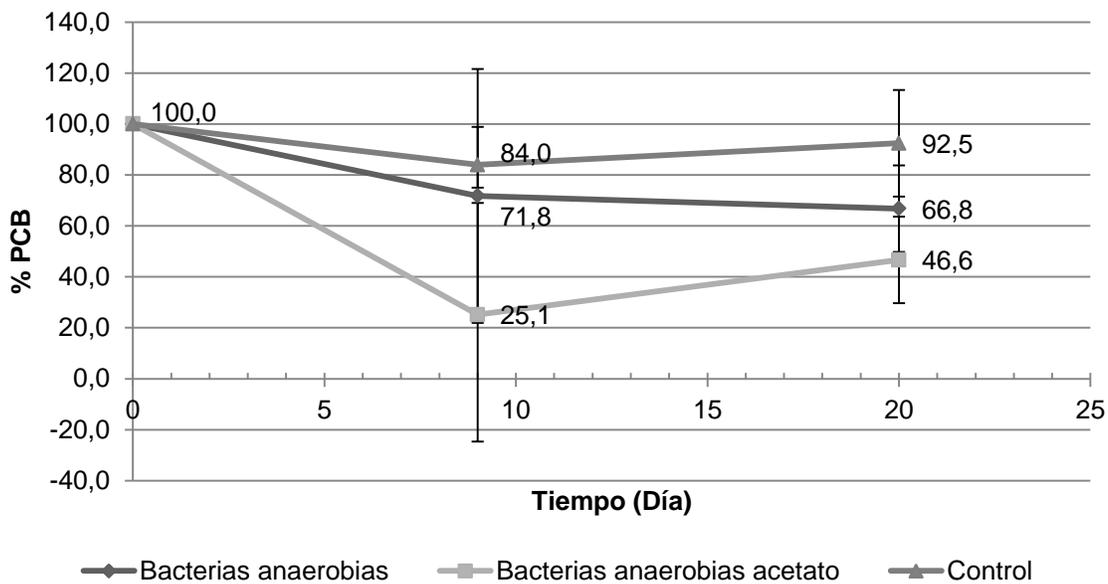
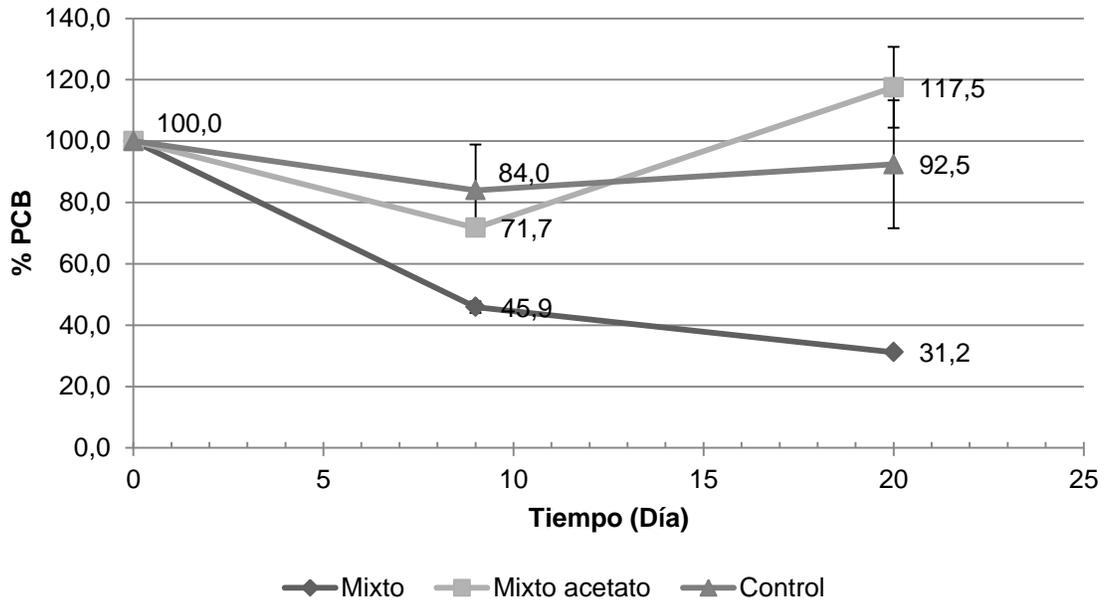


Ilustración 9. Degradación de PCB por consorcio de bacterias anaerobias y aerobias



Curvas de crecimiento de consorcios degradadores en presencia de PCB

Los crecimientos obtenidos de los consorcios degradadores de PCB de bacterias aerobias, bacterias anaerobias y mixtos (tabla 8) (ilustraciones 10, 11 y 12), durante el desarrollo de los ensayos de degradación dieron recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) muy similares entre todos los tratamientos, igualmente tuvieron comportamientos de crecimiento parecidos, dándose un crecimiento diaúxico en el cual presentaron dos fases exponenciales, la primera fase de crecimiento exponencial se presentó durante el periodo comprendido entre los 0-3 días, posterior a esto los cultivos alcanzaron una fase estacionaria transicional la cual tuvo una duración de 3 días, periodo tras el cual inician la segunda fase estacionaria que va comprendida entre los días 6 hasta el 9, luego de esto ingresaron en fase de muerte dándose un descenso en las concentraciones de microorganismos viables en los ensayos de degradación.

Tabla 8. Curvas de crecimiento de ensayos de degradación

Ensayo	Log UFC/mL											
	Día 0		Día 3		Día 6		Día 9		Día 13		Día 20	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
Bacterias aerobias	5.200	0.045	7.028	0.048	7.050	0.090	8.177	0.124	7.472	0.083	7.170	0.088
Bacterias aerobias acetato	5.237	0.082	7.077	0.129	7.106	0.032	8.005	0.005	7.360	0.080	7.218	0.067
Bacterias anaerobias	5.338	0.039	7.221	0.059	7.167	0.115	8.268	0.020	7.521	0.028	7.197	0.066
Bacterias anaerobias acetato	5.310	0.033	7.133	0.072	7.105	0.017	8.216	0.115	7.515	0.067	7.227	0.039
Hongos	3.476	0.039	4.028	0.024	4.301	0.022	4.623	0.071	4.730	0.054	4.799	0.082
Hongos glucosa	3.306	0.205	4.229	0.162	4.459	0.105	4.761	0.019	4.961	0.040	4.923	0.040
Mixto	5.381	0.060	6.932	0.036	7.282	0.016	8.110	0.092	7.552	0.137	7.217	0.031
Mixto acetato	5.399	0.033	6.992	0.008	7.282	0.008	8.054	0.022	7.260	0.233	7.179	0.073
Control	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.844	0.732	0.864	0.751	0.864	0.751

\bar{x} = Promedio; s= Desviación estándar

Ilustración 10. Curvas de crecimiento de ensayos con bacterias aerobias en presencia de aceite dieléctrico con PCB.

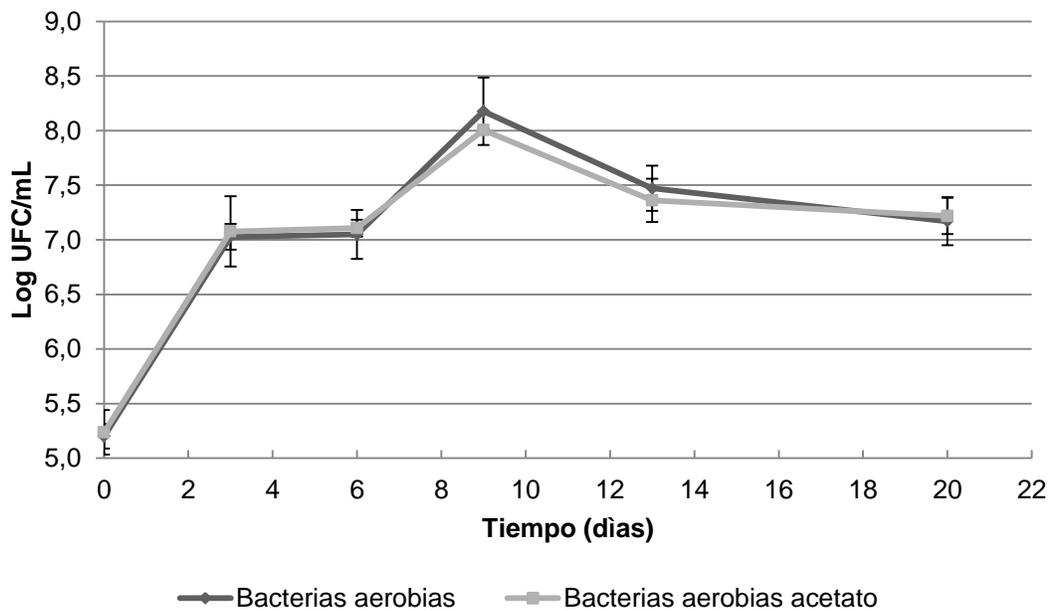


Ilustración 11. Curvas de crecimiento de ensayos con bacterias anaerobias en presencia de aceite dieléctrico con PCB.

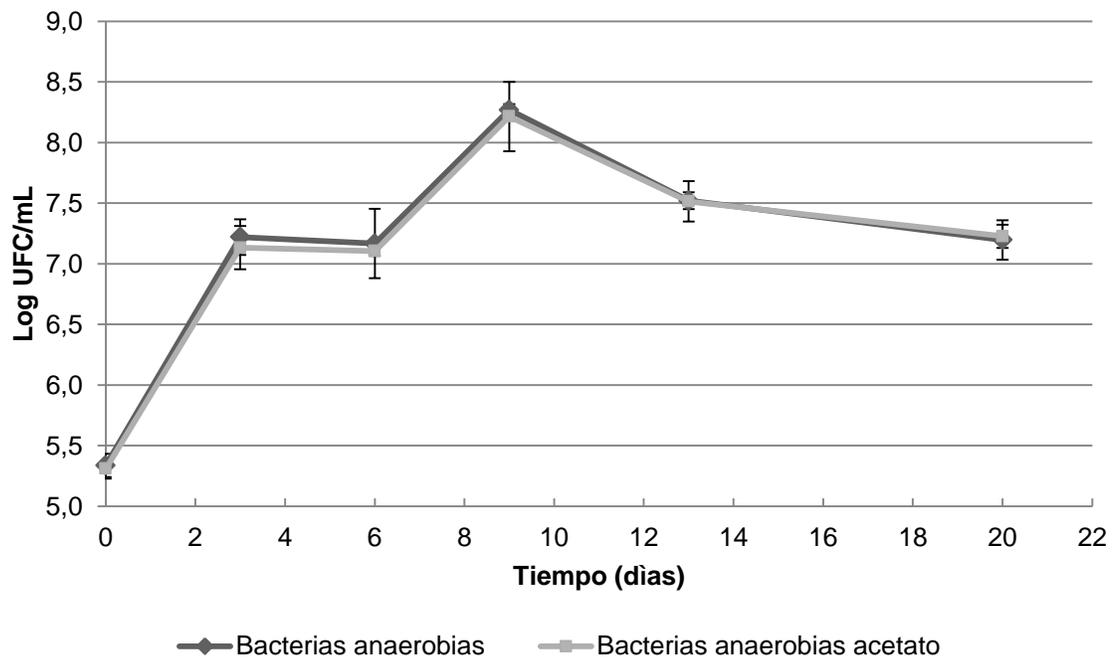
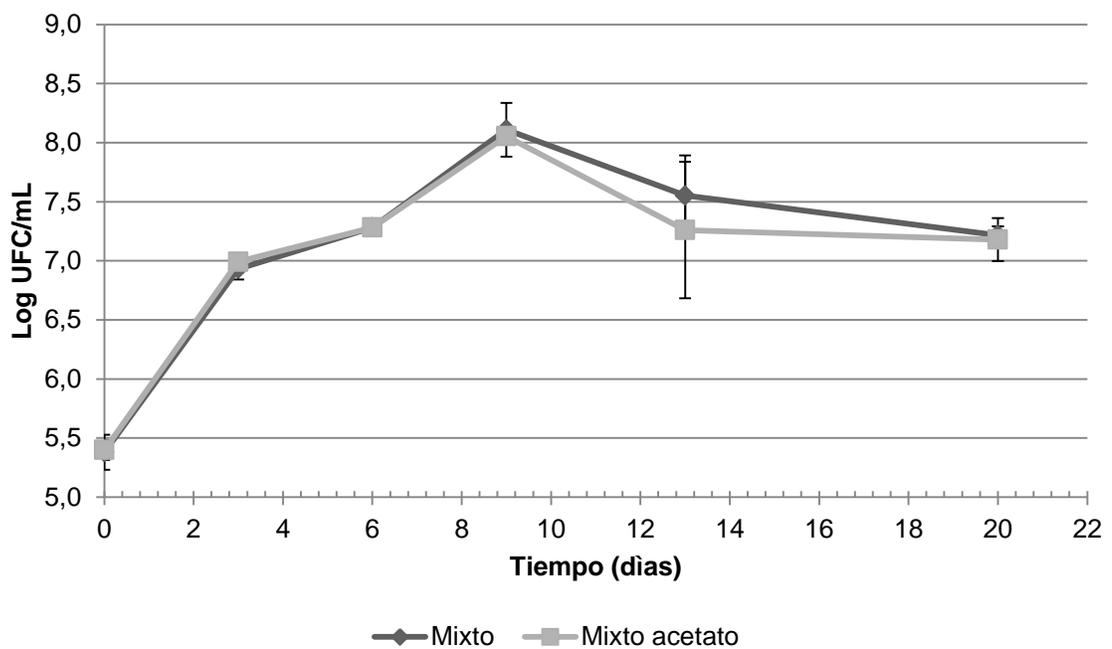


Ilustración 12. Curvas de crecimiento de ensayos mixtos en presencia de aceite dieléctrico con PCB.



En los tratamientos con hongos los datos de crecimiento microbiano sólo mostraron una fase exponencial sin crecimiento diaúxico (ilustración 13), presentándose una fase de adaptación inicial a las condiciones del medio de cultivo comprendida entre los 0-3 días, tras la cual incia una fase de crecimiento exponencial entre los 6-9 días, luego incian una fase aceleración negativa de crecimiento entre los 9 y 13 días, luego de la cual entran en fase estacionaria. En comparación con los resultados de recuentos de bacterias en UFC/mL, los tratamientos con hongos dieron valores inferiores a los realizados con bacterias, asimismo el tratamiento de hongos con la adición de glucosa presentó un crecimiento ligeramente superior al tratamiento sin una fuente de carbono alternativa.

Al contrastar los valores de crecimiento microbiano con los de degradación de PCB, se observa la tendencia a presentarse un descenso luego del día 9 en la tasa de degradación en todos los tratamientos, lo cual coincide con los valores obtenidos en las curvas de crecimiento en los cuales posterior al día 9 los microorganismos ingresaron a fase de muerte celular en los casos de tratamientos con bacterias. En contraste, los tratamientos con hongos también presentan una reducción de la tasa de degradación en el día 9 que coincide con el ingreso a fase de aceleración negativa durante este mismo periodo.

Ilustración 13. Curvas de crecimiento de ensayos con hongos en presencia de aceite dieléctrico con PCB.

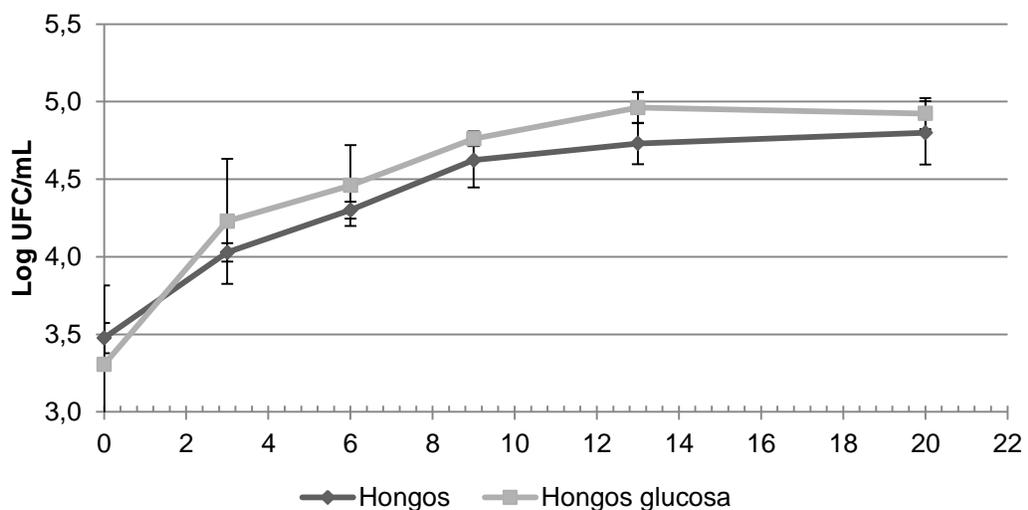


Tabla 9. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de consorcios

Ensayo	Velocidad máxima específica de crecimiento (hora ⁻¹)		Tiempo de duplicación td (hora)	
	μ max1	μ max2	Fase exponencial 1	Fase exponencial 2
Bacterias aerobias	0.0584	0.0362	11.8595	19.1430
Bacterias aerobias acetato	0.0591	0.0287	11.7274	24.1522
Bacterias anaerobias	0.0603	0.0349	11.4992	19.8662
Bacterias anaerobias acetato	0.0584	0.0358	11.8698	19.3603
Hongos	0.0068	-----	102.5707	-----
Hongos glucosa	0.0069	-----	101.0370	-----
Mixto	0.0496	0.0267	13.9865	25.9640
Mixto acetato	0.0509	0.0247	13.6164	28.0556

Con respecto a las características de desempeño de los tratamientos, los resultados de la velocidad máxima de crecimiento (μ max) y tiempo de duplicación (td) en los ensayos con bacterias presentan valores similares tanto para la fase exponencial 1 como la fase exponencial 2, no obstante se evidencia que los resultados de μ max1 son superiores en promedio 1.8 veces a los de μ max2, asimismo, el tiempo de duplicación durante la fase exponencial 1 es inferior en promedio 0.54 veces al de la fase exponencial 2 (tabla 9).

En referencia a los valores de μ max y td de los ensayos con hongos, al compararlos con los valores μ max 1 de las bacterias éstos son alrededor de 8 veces más lentos y el td de duplicación es 8 veces superior.

Sin embargo, al tener en cuenta los datos de la constante de Monod (K_s), se reflejan los resultados de las tasas de crecimiento en los cuales el tratamiento de hongos sin una fuente alternativa de carbono presentó la mayor afinidad por el sustrato aceite dieléctrico contaminado con PCB con un valor de K_s de 180.5 mg/L, seguido por el tratamiento de bacteria aerobias con acetato con un valor de K_s de 279 mg/L (tabla 10).

Tabla 10. Constante de Monod de cada cultivo ensayado

Ensayo	μ Total (horas)	Constante de Monod Ks (mg/L)
Bacterias aerobias	0.0088	512.3333
Bacterias aerobias acetato	0.0089	279.0000
Bacterias anaerobias	0.0090	732.3333
Bacterias anaerobias acetato	0.0088	555.6667
Hongos	0.0026	180.5547
Hongos glucosa	0.0044	341.8711
Mixto	0.0074	479.0000
Mixto acetato	0.0076	919.0000

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se utilizaron diversos consorcios microbianos, con el objetivo de evaluar la capacidad degradadora de éstos sobre aceite dieléctrico contaminado con PCB, usando diferentes sustratos como fuente de carbono y el uso de atmósferas aerobias y anaerobias. Los aislamientos de los microorganismos con capacidad de degradar PCB, dieron como resultado la obtención de los mohos *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus* y de los géneros de bacterias *Bacillus* y *Clostridium*, todos reportados como degradadores de PCB [60] [80]

Los tratamientos de bacterias aerobias con acetato presentaron una reducción significativa de la concentración de PCB, con 75.99%. Diversos trabajos han sido realizados con bacterias aeróbicas para el tratamiento de PCB. Borja y colaboradores 2006, degradaron PCB mediante el uso de bacterias aerobias, obteniendo una reducción de la concentración del 91% en 5 días de tratamiento, no obstante la concentración trabajada fue bastante baja, de 10 ppm [81]. Murinova y colaboradores 2014, degradaron una mezcla comercial de PCB denominada DELOR 103, utilizando bacterias aisladas de suelos y sedimentos contaminados e identificadas como *Alcaligenes xylooxidans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ochrobactrum anthropi* y *Pseudomonas veronii*. La concentración de PCB en este trabajo fue de 100 mg/L, obteniendo el porcentaje de degradación mayor de 55% con *Alcaligenes xylooxidans* [82]. De forma similar al presente trabajo, Egorova y colaboradores 2013, utilizaron las bacterias *Rhodococcus ruber* y *Microbacterium* sp. B51 para la degradación de PCB en suelos, cuya implementación da como resultado una marcada reducción en la concentración del contaminante, con contenidos residuales de PCB a los 90 días entre 3.6-26.8%. Así como el proceso de degradación llevado a cabo en conjunto por el consorcio de ambas bacterias aparenta ser más eficiente que por separado [83].

En cuanto los ensayos de degradación de bacterias anaerobias, las curvas muestran una reducción final hasta 66.8% y 46.6% para el tratamiento de bacterias anaerobias y bacterias anaerobias más acetato respectivamente, observándose un mayor porcentaje en el tratamiento con acetato, posiblemente por actuar la fuente alternativa de carbono

como donante de electrones para el proceso de respiración anaerobia. Esto ha sido reportado anteriormente en estudios de degradación de PCB's y otros compuestos organoclorados; Baba y Katayama 2007, han descrito que la degradación de PCB's en condiciones anaeróbicas se dio con el incremento de la población microbiana con el acetato como principal donante de electrones [84]. He y colaboradores 2002, analizaron la degradación de cloroetano en muestras de acuíferos con la adición de donantes de electrones como formiato, acetato, piruvato, lactato, fumarato, glicerol, glucosa, melaza e hidrogeno molecular (H_2), indicando que la presencia de acetato en el medio era necesaria para la declorinación completa del cloroetano, debido a que el consumo de acetato libera H_2 en una tasa adecuada para realizar el proceso de declorinación, sin competir con otros procesos metabólicos como la metanogénesis que también requieren H_2 [85]. Song y colaboradores 2015, lograron en 90 días de tratamiento la disminución de la concentración de congéneres altamente clorados, incluyendo PCB 209, PCB-189, PCB-183 y PCB-179, mientras que las concentraciones de PCB con entre cuatro y siete átomos de cloro aumentó, indicando un proceso decloración reductiva [86].

Los tratamientos de hongos con glucosa y hongos sin una fuente alternativa de carbono presentaron valores porcentuales de reducción de concentración de PCB 3.78% y 77.62% respectivamente, siendo el tratamiento de hongos sin fuente alternativa de carbono el que dio el mayor nivel de degradación entre todos los ensayos. Tigini y colaboradores 2009, aislaron diversas cepas de hongos de suelos con historial de contaminación con PCB's y probaron la capacidad de crecer en presencia de bifenilo y una combinación de dos congéneres de PCB's, siendo incapaces de crecer en medios con éstos compuestos como única fuente de carbono, sin embargo 13 cepas fueron capaces de desarrollarse en medios con PCB's más glucosa como fuente alternativa de carbono, pero con menor crecimiento [80]. Asimismo, Mouhamadou y colaboradores 2013, aislaron varios hongos entre los que se encuentran *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium chrysogenum*, y evaluaron la capacidad de degradar diferentes congéneres de PCB, alcanzando porcentajes de degradación del 78% [87]. En el ensayo de hongos más glucosa, se evidencia inicialmente al día 9 una disminución muy similar al ensayo de hongos sin glucosa, no obstante, al día 20 se da un aumento de la concentración de PCB hasta un 96.2%, debido a la acumulación de PCB dentro del micelio fúngico y una vez empieza el descenso del proceso de crecimiento es liberado nuevamente al medio de cultivo. Mouhamadou y

colaboradores 2013, reportaron que hongos *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum* son capaces de retener en el micelio 12.48% y 56% de PCB cuando no era necesario para el crecimiento del microorganismo. [87]

El ensayo mixto sin una fuente adicional de carbono alcanza un porcentaje de degradación de PCB hasta 68.82%, valor bastante bajo al esperado, y al compararlo con trabajos como el de Nabavi y colaboradores 2013, que utilizaron un sistema anaerobio/aerobio para la biodegradación de PCB con resultados entre 94.2% y 96.5%, partiendo de una concentración inicial de 200 mg/L y con un tiempo de duración de 85 días [88].

Al analizar la influencia de la fuente alternativa de carbono, el único grupo de microorganismos evaluado que presentó una mayor reducción de la concentración de PCB con la adición de ésta fue el de bacterias aerobias, en los tratamientos de hongos y mixto la presencia de otra fuente de carbono de fácil asimilación no repercutió en un aumento de la degradación de PCB, posiblemente implicando un consumo de las fuentes de carbono más sencillas de asimilar y no del PCB. Esto ya ha sido descrito por Murínová y colaboradores 2014, quienes reportaron que la degradación de PCB llevada a cabo con la presencia de un sustrato alternativo, es decir, sobre glucosa únicamente o acompañado de bifenilo a una concentración de 10 mg/L, estimuló el crecimiento bacteriano, dando como resultado un aumento en la remoción de PCB. Sin embargo esto no implica una estimulación de las enzimas degradadoras, más probable es que la mejora en la degradación se deba a un incremento de la biomasa bacteriana, implicando una reducción de la tasas de degradación cuando la concentración de glucosa era superior [82].

Al contrastar los valores de crecimiento microbiano con los de degradación de PCB, se observa la tendencia a presentarse un descenso luego del día 9 en la tasa de degradación en todos los tratamientos, lo cual coincide con los valores obtenidos en las curvas de crecimiento en los cuales posterior al día 9 los microorganismos ingresaron a fase de muerte celular en los casos de tratamientos con bacterias. Los tratamientos con hongos también presentan una reducción de la tasa de degradación en el día 9 que coincide con el ingreso a fase de aceleración negativa durante este mismo periodo. Esta reducción de las tasas degradación de PCB en los diferentes tratamientos puede ser

debido a la acumulación de metabolitos tóxicos para el consorcio como es el caso de los clorobenzoatos, los cuales inhiben el crecimiento de los degradadores de PCB, así como los describen Sondossi y colaboradores 1992 [89] y Hatamian-Zarmi y colaboradores 2009 [90].

Los crecimientos obtenidos de los consorcios degradadores de PCB de bacterias aerobias, bacterias anaerobias y mixtos tuvieron un crecimiento diaúxico en el cual presentaron dos fases exponenciales, este tipo de crecimiento se presenta cuando en el medio de cultivo existe más de 1 sustrato para crecimiento [91] [92], debido a la complejidad de la matriz de aceite dieléctrico y al contenido heterogéneo de hidrocarburos presentes, es probable que los microorganismos consumieran inicialmente las fuentes de carbono sencillas de asimilar y posteriormente realizaran la asimilación de PCB e hidrocarburos más complejos para la producción de biomasa y energía. No obstante, al tener en cuenta los valores de K_s , se reflejan que los hongos al no ser adicionada una fuente alternativa de carbono presenta una mayor afinidad por el sustrato aceite dieléctrico contaminado con PCB.

En referencia a los valores de μ_{max} para los ensayos con bacterias estos oscilaron en μ_{max1} entre 0.0603 h^{-1} y 0.0496 h^{-1} , y durante μ_{max2} entre 0.0362 h^{-1} y 0.0247 h^{-1} , valores de crecimiento de superiores a los reportados por Liz y colaboradores 2009, quienes utilizaron un consorcio de microorganismos aislados de suelos contaminados con aceite de transformador el cual fue capaz de crecer sobre Aroclor 1260 con una velocidad específica de crecimiento de 0.0031 h^{-1} [93]. Ilori y colaboradores 2008, describen velocidades específicas de crecimiento para *Achromobacter xylosoxidans* IR08 de 0.224 día^{-1} cuando era cultivada sobre 4-CB y 0.161 día^{-1} cuando era cultivada sobre 4,4-CB, también inferiores a las descritas en el presente trabajo para los consorcios [94]. Egorova y colaboradores 2013, tuvieron resultados de μ_{max} para *Rhodococcus ruber* y *Microbacterium* sp, de 1.49 día^{-1} y 1.77 día^{-1} tiempos de duplicación de 0.46 y 0.38 día, similares a los descritos en el presente trabajo. [83]

7. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir de los 8 tratamientos evaluados para la degradación de PCB, los ensayos con hongos y bacterias aerobias con acetato fueron adecuados para lograr la reducción del contaminante en la matriz de aceite dieléctrico, si bien no se alcanzó la eliminación completa, se logró una disminución de más del 75%, rendimiento importante en cuanto a la capacidad de eliminación de PCB, siendo destacable la actividad degradadora de los hongos utilizados sin una fuente de carbono de fácil asimilación como la glucosa, los cuales redujeron la cantidad de PCB inicial 5,5 veces.

De igual forma, los mayores niveles de degradación se presentan durante los primeros 9 días de ensayo, probablemente en este punto la producción de metabolitos tóxicos empiecen a acumularse en el sistema, producto de la misma actividad degradadora de los microorganismos. Asimismo, la adición de una fuente de carbono alternativa aumentó de forma significativa el nivel de reducción en bacterias aerobias. El efecto fue contrario en los tratamientos con hongos, es probable que sea debido a la naturaleza sacarofílica de los hongos que la adición de una fuente alternativa de carbono como la glucosa estimulara el crecimiento, más no la actividad degradadora de PCB's.

La obtención de parámetros de desempeño como, afinidad de la biomasa por el sustrato, velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación, permiten dar una mejor descripción del comportamiento microbiano en un proceso de biodegradación de un contaminante como PCB en una matriz compleja como el aceite de dieléctrico, con lo cual en próximas investigaciones sea posible realizar procesos de optimización de la biodegradación de PCB.

8. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de concentración de PCB en aceite dieléctrico de transformador

3. RESULTADOS

En las **Tablas 1-3** se reportan los resultados del análisis por cromatografía de gases con detector de captura de electrones de la(s) muestra(s) de aceite dieléctrico, agua y sedimento enviada(s) por la **UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL BARRANQUILLA**.

Tabla 1. Concentración de PCB (mg/kg) presentes en la(s) muestra(s) de aceite dieléctrico, enviada(s) por la **UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL BARRANQUILLA**.

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración de PCB (mg/kg de aceite)*
982754-01-AH	Muestra: Aceite dieléctrico, Código interno: 001, Cantidad: 50 mL	8814

Nivel mínimo de detección del método empleado (NMD= 1 mg de PCB total/kg de aceite, S/N = 3).

Nivel mínimo de cuantificación del método empleado (NMC=2 mg de PCB total/kg de aceite).

* Promedio de dos mediciones

Anexo 2. Aislamiento de hongos y bacterias

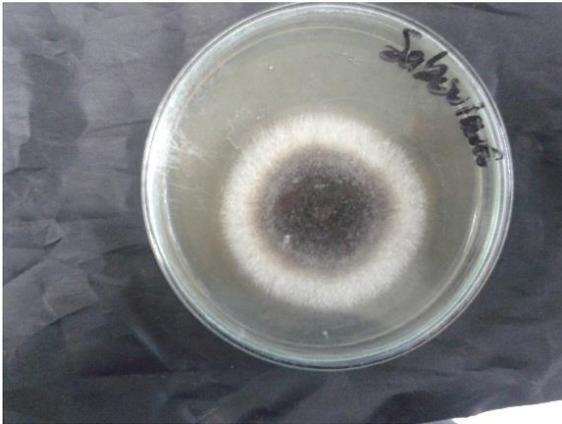


Ilustración 14. Fotografía de aislado de *Aspergillus flavus* en agar sabouraud



Ilustración 15. Fotografía de aislado de *Aspergillus fumigatus* en agar sabouraud



Ilustración 16. Fotografía de aislados de *Bacillus* sp. en agar nutritivo

Anexo 3. Tinción de gran de aislamientos bacterianos aerobios y anaerobios

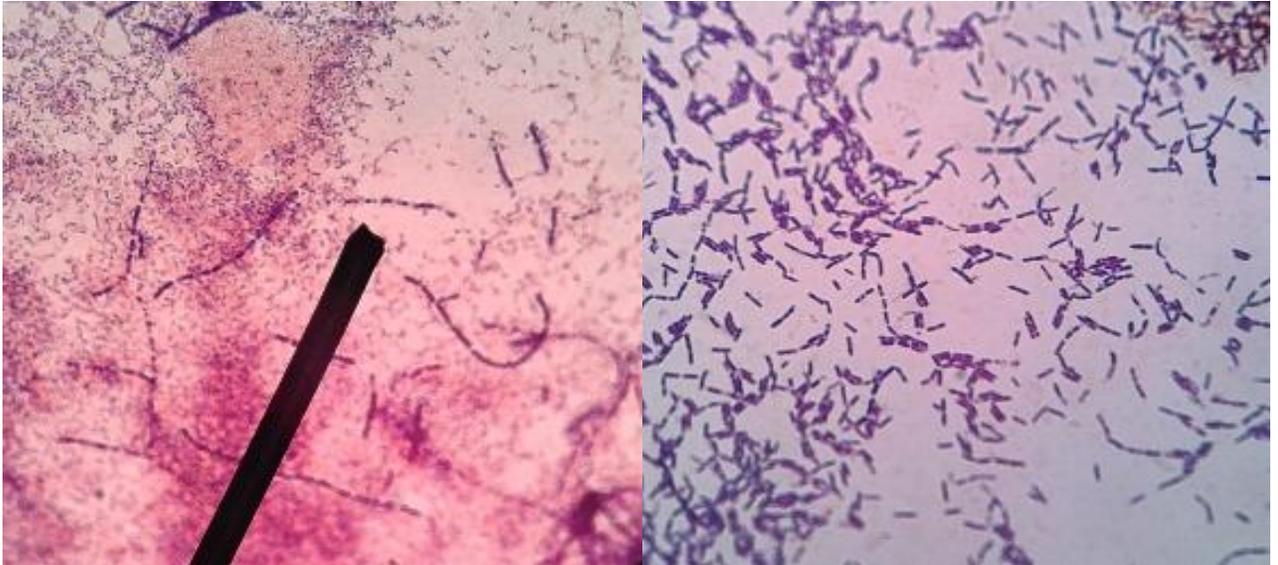


Ilustración 17. Fotografías de tinción de gram de *Bacillus* sp. células gram positivas con presencia de endosporas mediales

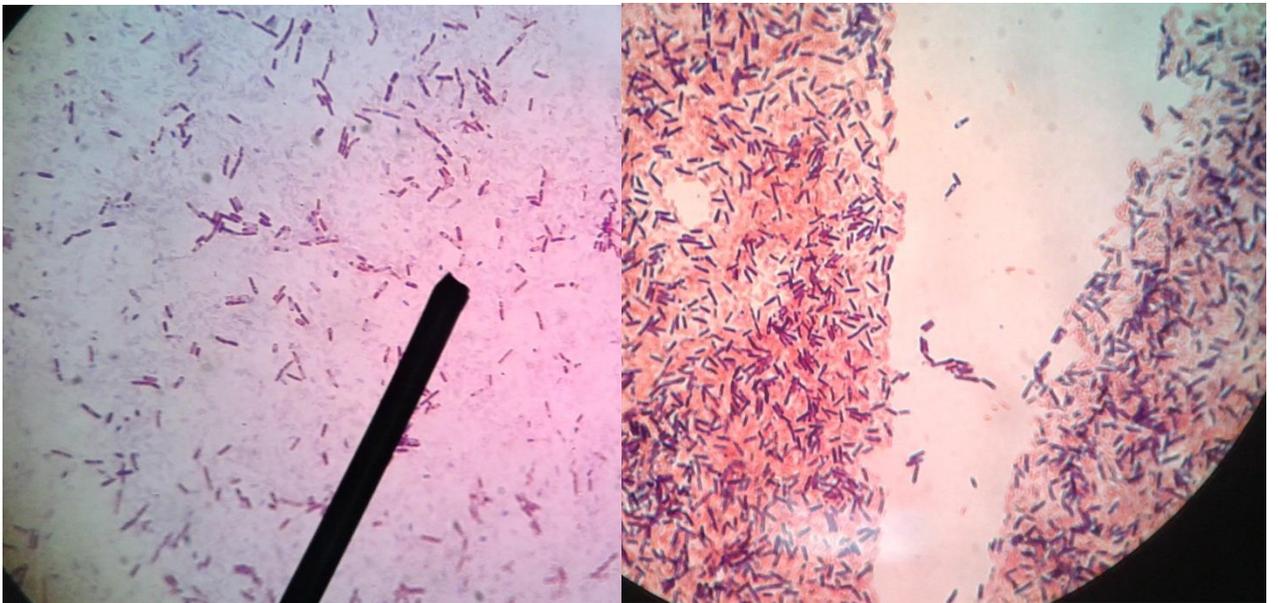


Ilustración 18. Fotografías de tinción de gram de aislados de *Clostridium* sp. células en forma de bastón gram positivas y con esporas terminales

Anexo 4. Resultados cromatográficos de tratamientos de degradación de PCB.



LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y
ESPECTROMETRÍA DE MASAS
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER



Bucaramanga, julio 08 de 2014

Profesora
ARACELY GARCÍA CUAN
Líder IMB
UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL BARRANQUILLA
Kilómetro 7 antigua vía Puerto Colombia
Tel: 5 359 8866
Fax: 5 349 3211
BARRANQUILLA – ATLÁNTICO

Estimada profesora Aracely:

Atentamente me permito enviarle el informe de resultados del análisis de bifenilos policlorados (PCB) por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC/ECD), de la(s) muestra(s) identificada(s) según la **Tabla 1**, del informe adjunto 984408-AC.

Estimado cliente, muy amablemente me permito solicitarle el favor de confirmar al email labcromauis@yahoo.com, elenastashenko@gmail.com la recepción de éste informe de resultados.

Muy cordialmente,

Elena E. Stashenko, Química Ph. D.
Directora General Crom-Mass,
Universidad Industrial de Santander



3. RESULTADOS

Tabla 1. Concentración de PCB (mg/L) presentes en la(s) muestra(s) de agua, enviada(s) por la empresa **UNIVERSIDAD LIBRE SECCIONAL BARRANQUILLA.**

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración de PCB (mg/L)
984408-01-AH	AE1 (9)	205
984408-02-AH	AE2 (9)	193
984408-03-AH	AE3 (9)	94
984408-04-AH	AEA1 (9)	65
984408-05-AH	AEA2 (9)	63
984408-06-AH	AEA3 (9)	94
984408-07-AH	AN1 (9)	93
984408-08-AH	AN2 (9)	135
984408-09-AH	AN3 (9)	56
984408-10-AH	ANC1 (9)	62
984408-11-AH	ANC2 (9)	59
984408-12-AH	ANC3 (9)	41
984408-13-AH	H1 (9)	70
984408-14-AH	H2 (9)	55
984408-15-AH	H3 (9)	77

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración de PCB (mg/L)
984408-16-AH	HG2 (9)	81
984408-17-AH	HG3 (9)	60
984408-18-AH	M1 (9)	108
984408-19-AH	M2 (9)	104
984408-20-AH	M3 (9)	73
984408-21-AH	MA1 (9)	71
984408-22-AH	MA3 (9)	85
984408-23-AH	C1 (9)	89
984408-24-AH	C2 (9)	136
984408-25-AH	C3 (9)	55
984408-26-AH	AE1 (20)	79
984408-27-AH	AE2 (20)	75
984408-28-AH	AE3 (20)	147
984408-29-AH	AEA1 (20)	95
984408-30-AH	AEA2 (20)	26
984408-31-AH	AEA3 (20)	58
984408-32-AH	AN1 (20)	93
984408-33-AH	AN2 (20)	127
984408-34-AH	AN3 (20)	54
984408-35-AH	ANC1 (20)	164
984408-36-AH	ANC2 (20)	75
984408-37-AH	ANC3 (20)	92
984408-38-AH	H1 (20)	159
984408-39-AH	H2 (20)	53
984408-40-AH	H3 (20)	89
984408-41-AH	HG1 (20)	20
984408-42-AH	HG2 (20)	224

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración de PCB (mg/L)
984408-43-AH	HG3 (20)	213
984408-44-AH	M1 (20)	72
984408-45-AH	M2 (20)	72
984408-46-AH	M3 (20)	128
984408-47-AH	MA1 (20)	132
984408-48-AH	MA2 (20)	144
984408-49-AH	MA3 (20)	109
984408-50-AH	C1 (20)	61
984408-51-AH	C2 (20)	141
984408-52-AH	C3 (20)	102
984408-53-AH	AE1 (0)	38
984408-54-AH	AE2 (0)	129
984408-55-AH	AE3 (0)	104
984408-56-AH	AEA1 (0)	160
984408-57-AH	AEA2 (0)	130
984408-58-AH	AEA3 (0)	207
984408-59-AH	AN1 (0)	27
984408-60-AH	AN2 (0)	111
984408-61-AH	AN3 (0)	255
984408-62-AH	ANC1 (0)	98
984408-63-AH	ANC2 (0)	293
984408-64-AH	ANC3 (0)	136
984408-65-AH	H1 (0)	108
984408-66-AH	H2 (0)	523
984408-67-AH	H3 (0)	257
984408-68-AH	HG1 (0)	156
984408-69-AH	HG2 (0)	205

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración de PCB (mg/L)
984408-70-AH	HG3 (0)	253
984408-71-AH	M1 (0)	226
984408-72-AH	M2 (0)	236
984408-73-AH	M3 (0)	189
984408-74-AH	MA1 (0)	101
984408-75-AH	MA2 (0)	138
984408-76-AH	MA3 (0)	325
984408-77-AH	C1 (0)	245
984408-78-AH	C2 (0)	197
984408-79-AH	C3 (0)	90
984408-80-AH	HG1 (9)	66
984408-81-AH	MA2 (9)	101

Nivel mínimo de cuantificación del método empleado (NMC=2 µg de PCB total/L muestra).

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Lopera y J. Aguirre, «Purificación De Aceites Aislantes Contaminados Con Bifenilos Policlorados (PCB's),» *Dyna*, vol. 73, nº 150, pp. 75-88, 2006.
- [2] Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Dirección desarrollo sectorial sostenible, *Inventario preliminar de Compuestos Bifenilos Policlorados (PCB) existente en Colombia*, Bogotá, 2007.
- [3] Canadian Council of Resource and Environment Ministers, «The PCB Story,» Toronto, Ontario, 1986.
- [4] M. Ferrante, G. Mattace Raso, E. Esposito, G. Bianco, A. Iacono, M. Clausi, P. Amero, A. Santoro, R. Simeoli, G. Autore y R. Meli, «Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway,» *Toxicology Letters*, nº 202, p. 61–68.
- [5] J. S. Park, M. Petreas, B. A. Cohn, P. M. Cirillo y P. Factor-Litvak, «Hydroxylated PCB metabolites (OH-PCBs) in archived serum from 1950–60s California mothers: A pilot study,» *Environment International*, nº 35, p. 937–942, 2009.
- [6] Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, *Decreto Número 4741. Reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral*, 2005.
- [7] Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible, *Resolución 222. Reglamenta requisitos para la gestión ambiental integral de equipos y desechos que consisten, contienen o están contaminados con Bifenilos Policlorados (PCB)*, Bogotá, 2011.
- [8] D. Kishore y A. K. Mukherjee, «Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India,» *Bioresource Technology*, vol. 98, p. 1339–1345, 2007.
- [9] M. Ghazali Farinazleen , A. Raja Noor Zaliha, A. Bakar Salleh y M. Basri, «Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium,» *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 54, p. 61–67, 2004.
- [10] F. P. Chávez, F. Gordillo y C. A. Jerez, «Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyl-degrading bacteria toward polychlorinated biphenyls,» *Biotechnology Advances*, vol. 24, p. 309– 320, 2006.
- [11] J. Borja, D. M. Taleon, J. Auresenia y S. Gallardo, «Polychlorinated biphenyls and their biodegradation,» *Process Biochemistry*, vol. 40, p. 1999–2013, 2005.
- [12] L. Osorio y J. Ibón, *Aislamiento e identificación de hongos tolerantes a aceites dielectricos a partir de suelos contaminados*, Barranquilla, Universidad Libre, 2007.
- [13] M. Ariza y L. López, «Aislamiento de microorganismos tolerantes a PCB's a

- partir de suelos adyacentes a la antigua planta “El Río”,» Barranquilla, 2008.
- [14] L. Barrios y M. Cepeda, *Ensayos de supervivencia de hongos sometidos a diferentes concentraciones del Bifenilos policlorados, PCB's (AROCLOR 1260)*, Barranquilla, Universidad Libre, 2008.
- [15] K. Oñoro y M. Poveda, *Recuperación de microorganismos presentes en aceites dieléctricos usados*, Barranquilla, Universidad Libre, 2009.
- [16] M. Snell, D. I. Thal y J. Barney, «A summary of the 209 PCB congener nomenclature,» *Chemosphere*, vol. 68, p. 1603–1612, 2007.
- [17] Y. Lai, W. Pan, S. Ni, D. Zhang y J. Zhan, «Theoretical evaluation of the configurations and Raman spectra of 209 polychlorinated biphenyl congeners,» *Chemosphere*, vol. 85, p. 412–417, 2011.
- [18] K. Breivik, A. Sweetman, J. M. Pacyna y K. C. Jones, «Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners — a mass balance approach: 1. Global production and consumption,» *Science of The Total Environment*, vol. 290, p. 181–198, 2002.
- [19] M. L. Hardy, «A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products,» *Chemosphere*, vol. 46, p. 717–728, 2002.
- [20] T. R. Head, «PCBs—The Rise and Fall of an Industrial Miracle,» *Natural Resources & Environment*, vol. 19, nº 4, pp. 15-19, 2005.
- [21] UNEP, SECRETARÍA DEL CONVENIO DE BASILEA, *Manual de Capacitación. Preparación de un plan nacional de manejo ambientalmente adecuado de los Bifenilos Policlorados (PCB) y de equipos contaminados con PCB*, Serie del Convenio de Basilea, 2003/1.
- [22] K. Rapp, «Coking Tendency of Dielectric Fluids at Contact Surfaces – Phase I: Constant Current,» 2003.
- [23] I. Pillai, «Identification and carcinogenicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Transformer Oil,» 2003.
- [24] K. Norström, G. Czub, M. S. McLachlan, D. Hu, P. S. Thorne y K. C. Hornbuckle, «External exposure and bioaccumulation of PCBs in humans living in a contaminated urban environment,» *Environment International*, vol. 36, p. 855–861, 2010.
- [25] A. S. Mortensen y A. Arukwe, «Estrogenic effect of dioxin-like aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist,» *Marine Environmental Research*, vol. 66, p. 119–120, 2008.
- [26] V. Venkatasubbaiah, K. Amanda, S. Ehab y P. G., «PCB-153 exposure coordinates cell cycle progression and cellular metabolism in human mammary epithelial cells,» *Toxicology Letters*, vol. 196, p. 110–116, 2010.
- [27] J. F. Gierthy, K. F. Arcaro y M. Floyd, «Assessment of PCB estrogenicity in a human breast cancer cell line,» *Chemosphere*, vol. 34, pp. 1495-1505, 1997.
- [28] M. P. Lind, E. F. Eriksen, L. Sahlin, M. Edlund y J. Örberg, «Effects of the

- Antiestrogenic Environmental Pollutant 3,3',4,4',5,5'- Pentachlorobiphenyl (PCB #126) in Rat Bone and Uterus: Diverging Effects in Ovariectomized and Intact Animals,» *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 154, p. 236–244, 1999.
- [29] J. A. Sánchez Alonso, P. López Aparicio, M. N. Recio y M. A. Pérez Albarsanz, «Apoptosis-mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures,» *Toxicology Letters*, vol. 144, 2003.
- [30] M. Fernández Santiago, P. L. Pérez Reyes, P. López Aparicio, M. N. Recio y M. A. Pérez Albarsanz, «Differential effects of PCBs on the induction of apoptosis machinery and PKC translocation in rat renal tubular cell cultures,» *Toxicology Letters*, vol. 163, p. 91–100, 2006.
- [31] A. S. Howard, R. Fitzpatrick, I. Pessah, P. Kostyniak y P. J. Lein, «Polychlorinated biphenyls induce caspase-dependent cell death in cultured embryonic rat hippocampal but not cortical neurons via activation of the ryanodine receptor,» *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 190, p. 72–86, 2003.
- [32] M. Ferrante, G. Mattace Raso, E. Esposito, G. Bianco, A. Iacono, M. Clausi, P. Amero, A. Santoro, R. Simeoli, G. Autore y R. Meli, «Effects of non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alone or mixed on J774A.1 macrophage cell line: modification of apoptotic pathway,» *Toxicology Letters*, vol. 202, p. 61–68, 2011.
- [33] Stockholm Convention, «Stockholm Convention,» United Nations Environment Programme (UNEP), [En línea]. Available: <http://chm.pops.int/default.aspx>. [Último acceso: 25 Noviembre 2015].
- [34] United Nations Environment Program (UNEP), « Stockholm Convention,» [En línea]. Available: <http://chm.pops.int/Convention/tabid/54/Default.aspx>. [Último acceso: Junio 2013].
- [35] United States Environmental Protection Agency , «EPA,» [En línea]. Available: <http://www.epa.gov/international/toxics/pop.html#stockholm>.
- [36] H.-S. An, S.-S. Park, K.-H. Kim, S.-U. Park y T.-I. Ohm, «Treatment of PCB-contaminated pole transformers by vacuum thermal recycling with voltage adjuster,» *Process Safety and Environmental Protection*, vol. 89, p. 268–274, 2011.
- [37] I.-H. Jung, M.-J. Lee y Y.-J. Mah, «Decomposition of PCBs in transformer oil using an electron beam accelerator,» *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 81, p. 899–905, 2012.
- [38] B. J. Mincher, R. Brey, R. G. Rodriguez, S. Pristupa y A. Ruhter, «Increasing PCB radiolysis rates in transformer oil,» *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 65, p. 461–465, 2002.
- [39] V. Marulanda y G. Bolaños, «Supercritical water oxidation of a heavily PCB-contaminated mineral transformer oil: Laboratory-scale data and economic assessment,» *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 54, p. 258–265, 2010.

- [40] S. A. Adebusoye, M. O. Ilori, F. W. Picardal y O. Amund, «Cometabolic degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by axenic cultures of *Ralstonia* sp. strain SA-5 and *Pseudomonas* sp. strain SA-6 obtained from Nigerian contaminated soils,» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, p. 61–68, 2008.
- [41] D. H. Pieper, «Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 67, p. 170–191, 2005.
- [42] Z. Arbeli, «BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES (COP): I. EL CASO DE LOS BIFENILOS POLICLORADOS (PCB),» *Acta Biológica Colombiana*, vol. 14, nº 1, pp. 55 - 86, 2009.
- [43] D. Abramowicz. y D. Olson, «Accelerated biodegradation of PCBs,» *Chemtech*, vol. 25, pp. 36-41, 1995.
- [44] D. Bedard y J. F. Quensen, «Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. In: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals,» Young, L.Y. And Cerniglia, C., New York, 1995.
- [45] K. Furukawa, «Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs),» *Journal of Genetics and Applied Microbiology*, vol. 46, pp. 283-296, 2000.
- [46] J. F. Brown, D. L. Bedard y M. J. Brennan, «Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments,» *Science*, vol. 236, pp. 709-712, 1987.
- [47] J. F. Brown, R. E. Wagner, H. Feng y D. L. Bedard, «Environmental dechlorination of PCBs,» *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 6, pp. 579 - 593, 1987.
- [48] J. F. Brown y R. E. Wagner, «PCB movement, dechlorination, and detoxication in the Acushnet estuary,» *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, pp. 1215-1233, 1990.
- [49] Q. Wu, D. L. Berdard, J. Wiegel y J. Wiegel, «Temperature determines the pattern of anaerobic microbial dechlorination of Aroclor 1260 primed by 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in Woods Pond sediment,» *Applied Environmental Microbiology*, vol. 63, pp. 4818-4825, 1997.
- [50] D. L. Berdard, H. M. Van Dort, R. J. May y L. A. Smullen, «Enrichment of microorganisms that sequentially meta, para-dechlorinate the residue of Aroclor 1260 in Housatonic River sediment,» *Environmetal Science Technology*, vol. 31, pp. 3308-3313, 1997.
- [51] J. Quensen, S. A. Boyd y J. M. Tiedje, «Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments,» *Applied Environmental Microbiology*, vol. 56, pp. 2360-2369, 1990.
- [52] M. Berkaw, K. R. Sowers y M. S. K. A. M. H. D. Berkaw, «Anaerobic ortho dechlorination of polychlorinated biphenyls by estuarine sediments from Baltimore Harbor,» *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62, pp. 2534-2539, 1996.

- [53] Q. Wu, D. L. Bedard y J. Wiegel, «Effect of incubation temperature on the route of microbial reductive dechlorination of 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated and PCB-free freshwater sediments,» *Applied Environmental Microbiology*, vol. 63, pp. 2836-2843.
- [54] W. A. Williams, «Microbial reductive dechlorination of trichlorobiphenyls in anaerobic sediment slurries,» *Environmental Science Technology*, vol. 28, pp. 630-635, 1994.
- [55] J. Wiegel y Q. Wu, «Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls,» *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 32, pp. 1-15, 2000.
- [56] E. Master, «Polychlorinated Biphenyl (PCB) metabolism in psychrotolerant and mesophilic bacteria: from substrate uptake to catalysis,» 2001.
- [57] J. A. Field y R. Sierra Alvarez, «Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls,» *Environmental Pollution*, vol. 155, pp. 1-12, 2008.
- [58] K. Furukawa y T. Miyazaki, «Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*,» *Journal of Bacteriology*, vol. 166, pp. 392-3998, 1986.
- [59] K. Furukawa, «Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. Biodegradation,» *Biodegradation*, vol. 5, pp. 289-300, 1994.
- [60] K. Furukawa y H. Fujihara, «Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls: Biochemical and Molecular Features,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 105, nº 5, pp. 433-449, 2008.
- [61] M. Komancová, I. Jurcová, L. Kochánková y J. Burkhard, «Metabolic pathways of polychlorinated biphenyls degradation by *Pseudomonas* sp. 2,» *Chemosphere*, vol. 50, p. 537-543, 2003.
- [62] R. Clark, E. Chian y R. Griffin, «Degradation of polychlorinated biphenyls by mixed microbial cultures,» *Applied Environmental Microbiology*, vol. 37, p. 680-685, 1979.
- [63] D. Bedard, R. Unterman, L. Bopp, M. J. Brennan, M. L. Haberl y C. Johnson, «Rapid Assay for Screening and Characterizing Microorganisms for the Ability to Degrade Polychlorinated Biphenyls,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 51, nº 4, pp. 761-768, 1986.
- [64] D. Bedard y M. Haberl, «Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains,» *Microbial Ecology*, vol. 20, pp. 87-102, 1990.
- [65] G. Ruiz Aguilar y J. Fernández Sánchez, «Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil,» *Advances in Environmental Research*, vol. 6, p. 559-568, 2002.
- [66] M. Stajic, L. Persky, D. Friesem y Y. Hadar, «Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species,» *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, p. 65-73, 2006.

- [67] A. Kubátová, P. Erbanová y I. Eichlerová, «PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil,» *Chemosphere*, vol. 43, p. 207–215, 2001.
- [68] M. Cvancarova, Z. Kresinova, A. Filipova y S. Covino, «Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products,» *Chemosphere*, vol. 88, p. 1317–1323, 2012.
- [69] M. F. Carvalho y C. Alves, «Isolation and Initial Characterization of a Bacterial Consortium Able To Mineralize Fluorobenzene,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, pp. 102-105, 2002.
- [70] L. Adrian y W. Manz, «Physiological Characterization of a Bacterial Consortium Reductively Dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-Trichlorobenzene,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, pp. 496-503, 1998.
- [71] M. Romero y H. Reinoso, «Chlorinated biphenyl degradation by wild yeasts pre-cultured in biphasic systems,» *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 9, p. 241.247, 2006.
- [72] S. A. Adebusoye, F. W. Picardal, M. O. Ilori, O. Amund, C. Fuqua y N. Grindle, «Aerobic degradation of di- and trichlorobenzenes by two bacteria isolated from polluted tropical soils,» *Chemosphere*, vol. 66, p. 1939–1946, 2007.
- [73] T. Ohmori, H. Morita, M. Tanaka, K. Miyauchi, D. Kasai, K. Furukawa, K. Miyashita, N. Ogawa, E. Masai y M. Fukuda, «Development of a strain for efficient degradation of polychlorinated biphenyls by patchwork assembly of degradation pathways,» vol. 111, n° 4, p. 437–442, 2011.
- [74] L. Osorio y J. Ibón, *Aislamiento e identificación de hongos tolerantes a aceites dieléctricos a partir de suelos contaminados*, Barranquilla, Universidad Libre, 2007.
- [75] M. C. Ariza y L. López, *Aislamiento de microorganismos tolerantes a PCB's a partir de suelos adyacentes a la antigua planta "El Río"*, Barranquilla, Universidad Libre, 2008.
- [76] L. Barrios y M. Cepeda, *María. Ensayos de supervivencia de hongos sometidos a diferentes concentraciones del Bifenilos policlorados, PCB's (AROCLOR 1260)*, Barranquilla, Universidad Libre, 2008.
- [77] K. Oñoro y M. Poveda, *Recuperación de microorganismos presentes en aceites dieléctricos usados*, Barranquilla, Universidad Libre, 2009.
- [78] Y. Dingyi, J. F. I. Quensen, J. M. Tiedje y S. A. Boyd, «Anaerobic Dechlorination of Polychlorobiphenyls (Aroclor 1242) by Pasteurized and Ethanol-Treated Microorganisms from Sediments,» *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 58, pp. 1110-1114, 1992.
- [79] L. Cutter, K. R. Sowers y H. D. May, «Microbial Dechlorination of 2,3,5,6-Tetrachlorobiphenyl under Anaerobic Conditions in the Absence of Soil or Sediment,» *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 64, p. 2966–2969, 1998.
- [80] V. Tigini y V. Prigione, «Isolation and characterisation of polychlorinated

- biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil,» *Microbial Cell Factories*, vol. 8, pp. 1-14, 2009.
- [81] J. Borja, J. Auresenia y S. Gallardo, «Biodegradation of polychlorinated biphenyls using biofilm grown with biphenyl as carbon source in fluidized bed reactor,» *Chemosphere*, vol. 64, p. 555–559, 2006.
- [82] S. Murínová, K. Dercová y H. Dudásová, «Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by four bacterial isolates obtained from the PCB-contaminated soil and PCB-contaminated sediment,» *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 91, pp. 52-59, 2014.
- [83] D. Egorova, V. Demakov y E. Plotnikova, «Bioaugmentation of a polychlorobiphenyl contaminated soil with two aerobic bacterial strains,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 261, p. 378– 386, 2013.
- [84] D. Baba y A. Katayama , «Enhanced anaerobic biodegradation of Polychlorinated Biphenyls in burnt soil culture,» *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 104, pp. 62-68, 2007.
- [85] J. He y Y. Sung, «Acetate versus Hydrogen as Direct Electron Donors To Stimulate the Microbial Reductive Dechlorination Process at Chloroethene-Contaminated Sites,» *Environmental Science & Technology*, vol. 36, pp. 3945-3952, 2002.
- [86] M. Song, C. Luo, F. Li, L. Jiang, Y. Wang, D. Zhang y Zhang G., «Anaerobic degradation of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polychlorinated Biphenyls Ethers (PBDEs), and microbial community dynamics of electronic waste-contaminated soil,» *Science of the Total Environment*, vol. 502, p. 426–433, 2015.
- [87] B. Mouhamadou, M. Faure, L. Sage, J. Marcais, F. Sourd y R. Geremia, «Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls,» *Fungal Biology*, vol. 117, pp. 268-274, 2013.
- [88] B. Nabavi, M. Nikaeen, M. Amin y H. Farrokhzadeh, «Biological treatment of polychlorinated biphenyls (PCBs) contaminated transformer oil by anaerobiceaerobic sequencing batch biofilm reactors,» *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 85, pp. 451-457, 2013.
- [89] M. Sondossi, M. Sylvestre y D. Ahmad, «Effects of chlorobenzoate transformation on the Pseudomonas testosterone biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, p. 485–495, 1992.
- [90] A. Hatamian-Zarmi, S. Abbas Shojaosadati, E. Vasheghani-Farahani, S. Hosseinkhani y A. Emamzadeh, «Extensive biodegradation of highly chlorinated biphenyl and Aroclor 1242 by Pseudomonas aeruginosa TMU56 isolated from contaminated soils,» *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 63, p. 788–794, 2009.
- [91] K. Korárová-Kovar y T. Egli, «Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells:

- From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics,» *Microbiology and molecular reviews*, vol. 62, nº 3, p. 646–666, 1998.
- [92] K. Lee, J. Park y I. S. Ahn, «Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 157–167, p. 157–167, 2003.
- [93] J.-E. Liz, J. Jan-Roblero, J.-D. de la Serna, A.-P. de Leon y C. Hernandez, «Degradation of polychlorinated biphenyl (PCB) by a consortium obtained from a contaminated soil composed of *Brevibacterium*, *Pandora* and *Ochrobactrum*,» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, p. 165–170., 2009.
- [94] M. Ilori , G. K. Robinson y S. Adebusoye, «Aerobic mineralization of 4,4-dichlorobiphenyl and 4-chlorobenzoic acid by a novel natural bacterial strain that grows poorly on benzoate and biphenyl,» *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, p. 1259–1265., 2008.