



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del Título de
Ingeniería en Gestión Ambiental

Proyecto de Investigación:

**“DETERMINACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL EN BIODEGRADACIÓN
DE NITROBENCENO”.**

Autor:

Peñañiel Jaramillo María Fernanda

Docente Auspiciante:

Ing. Nicolás Javier Cruz Rosero, PhD.

Quevedo-Los Ríos- Ecuador

2020

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **PEÑAFIEL JARAMILLO MARIA FERNANDA**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

PEÑAFIEL JARAMILLO MARIA FERNANDA

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Ing. Nicolás Javier Cruz Rosero PhD, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresada **Peñañiel Jaramillo María Fernanda**, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero en Gestión Ambiental titulado “Determinación de bacterias con potencial en biodegradación de nitrobenzeno”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Ing. Nicolás Javier Cruz Rosero PhD
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

	
Document Information	
Analyzed document	TESIS-FORMATO-PEÑAFIEL.docx (D77005149)
Submitted	7/24/2020 5:21:00 AM
Submitted by	
Submitter email	hcanchignia@uteq.edu.ec
Similarity	3%
Analysis address	hcanchignia.uteq@analysis.arkund.com

Ing. Nicolás Javier Cruz Rosero PhD
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“DETERMINACIÓN DE BACTERIAS CON POTENCIAL EN BIODEGRADACIÓN DE NITROBENCENO”.

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero en Gestión Ambiental.

Aprobado por:

Ing. Jaime Morante Carriel "PhD

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ing. Harrys Lozano Mendoza
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Wiston Morales Rodríguez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Quevedo - Los Ríos - Ecuador

2020

AGRADECIMIENTO

Deseo dejar constancia de sinceros agradecimientos a las personas que hicieron posible la realización de esta tesis:

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, alma mater que me acogió como estudiante y a los catedráticos quienes impartieron las unidades de aprendizaje en la carrera Ingeniería en Gestión Ambiental, por compartir sin reservas sus conocimientos durante el proceso de formación académica.

Deseo expresar mi agradecimiento al director de tesis Ing. For. Nicolás Cruz, por el tiempo dedicado en la culminación exitosa de la presente investigación.

Al laboratorio de Biotecnología, por la dedicación y apoyo que han brindado a esta tesis, especialmente mi esposo, Ing. Hayron Canchignia, PhD.

Al Ing. Antonio Mendoza por su confianza y apertura durante la estancia en el laboratorio, al Ing. Ángel Cedeño Moreira, por sus instrucciones e ideas geniales y al Ing. Jorge Rodríguez por compartir sus conocimientos.

A mi mamá por su apoyo incondicional, a mis hermanas quienes siempre estuvieron alentándome para perseverar y culminar este proceso.

A mis compañeros y amigos (que son muchos) conocidos en la universidad durante el transcurso de la carrera, que de forma desinteresada compartieron sus conocimientos, momentos alegres y tristes también, con quienes nos unen lazos de amistad muy estrechos.

DEDICATORIA

A mis hijos:

Estoy de acuerdo en que cualquier edad es perfecta para alcanzar el éxito, pues éste no se mide por lo que logras, sino por los obstáculos que vences y que tampoco existe una secuencia u orden para lograr las metas en la vida, este nuevo reto planteado ha sido una excelente manera de enseñar con el ejemplo, que con perseverancia se pueden alcanzar los ideales propuestos, que trabajar duro te llevará a la cima, pero disfrutar del camino te llevará más lejos, ustedes, mi familia son mi prioridad y principal motivación para enfrentar cada día con mucho entusiasmo y no rendirme ante las dificultades.

RESUMEN EJECUTIVO

Las bacterias biodegradadoras de compuestos aromáticos se han descrito por su capacidad de reducir la contaminación y ayudar a la protección ambiental frente a agentes contaminantes que atenúan contra su entorno, así también efectúa una acción sinérgica para la preservación del medio ambiente. La presente investigación tuvo como objetivo seleccionar e identificar la cepa idónea con capacidad biodegradadora de nitrobenceno. La selección de bacterias se las clasificó por la característica morfológica y bioquímica dando valores de: (+) presencia, (++) presencia alta, (-) ausencia. Para el estudio de degradación de nitrobenceno, un diseño bloque completamente al Azar (DCA), con 12 tratamientos en 3 repeticiones con un control positivo (RE4) y negativo (*E. Coli*). Las bacterias biorremediadora con mayores efectos en las diferentes pruebas bioquímicas (catalasa, fosfatasa, ureasa) fueron Cha0, R4, PM 2/12, BO 3/8, PM 3/14, DICM GBF, DIC (1) TEMP, DIC Omg, CL0 Mg, DIC 4M, DIC 3 MBFA. El crecimiento mediante espectrofotometría a 600 nm confirmó el incremento celular en las cepas DICmgBF y GL3 con una absorbancia de 1,23 y 1,18 respectivamente. Las agrupaciones filogenéticas están divididas en 2 grupos con aproximaciones evolutivas altas el grupo A está confirmado por, Cha0, R4, PM 2/12, BO 3/8, PM 3/14, DIC (1) TEMP, DICM CBF, DIC 3 MBF. El grupo 2 (B) se subdivide en B1 y B2 donde la primera agrupación corresponde DIC 4M, DIC Omg, CLa Mg y GL1. y la segunda agrupación GL3 y CP3 quienes fueron las cepas que mostraron mayor crecimiento en el medio de cultivo a 600 ppm de nitrobenceno.

Palabras clave: Bacterias, biodegradación, nitrobenceno, pruebas bioquímicas, espectrofotometría.

ABSTRAC

Biodegradable bacteria of aromatic compounds have been described for their ability to reduce pollution and help protect the environment against pollutants that attenuate against their environment, as well as acting synergistically to preserve the environment. The objective of this research was to select and identify the ideal strain with biodegradable nitrobenzene capacity. The selection of bacteria was classified by the morphological and biochemical characteristics, giving values of: (+) presence, (++) high presence, (-) absence. For the study of nitrobenzene degradation, a completely Randomized design (DCA), with 12 treatments in 3 repetitions with a positive control (RE4) and negative (E. Coli). The bioremediator bacteria with the greatest effects in the different biochemical tests (catalase, phosphatase, urease were Cha0, R4, PM 2/12, BO 3/8, PM 3/14, DICM GBF, DIC (1) TEMP, DIC Omg, CL0 Mg, DIC 4M, DIC 3 MBFA Growth by spectrophotometry at 600 nm confirmed the cellular increase in the DICmgBF and GL3 strains with an absorbance of 1.23 and 1.18, respectively. The phylogenetic groups are divided into 2 groups with evolutionary approaches. discharges the group is confirmed by, Cha0, R4, PM 2/12, BO 3/8, PM 3/14, DEC (1) TEMP, DICM CBF, DEC 3 MBF. Group 2 (B) is subdivided into B1 and B2 where the first group corresponds DIC 4M, DIC Omg, CLa Mg and GL1. and the second group GL3 and CP3 who were the strains that showed the highest growth in the culture medium at 600 ppm of nitrobenzene.

Keywords: Bacteria, biodegradation, nitrobenzene, biochemical tests, spectrophotometry.

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE.....	iv
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN EJECUTIVO.....	viii
ABSTRAC	ix
TABLA DE CONTENIDO.....	x
CÓDIGO DUBLÍN	xiv
Introducción	1
CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.1. Problema de la investigación.....	5
1.1.1. Planteamiento del problema	5
1.1.2. Formulación del problema	8
1.1.3. Sistematización del Problema	8
1.2. Objetivos	9
1.2.1. Objetivo general	9
1.2.2. Objetivos específicos	9
1.3. Justificación.....	10
CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
2.1. Marco Conceptual.....	12
2.1.1. Compuestos orgánicos persistentes.....	12
2.1.2. Benceno.....	12
2.1.3. Mecanismo de transporte de un COP.....	13
2.1.4. Compuestos Nitroaromáticos	13
2.1.4.1. Nitrobenceno	13
2.1.4.2. Toxicidad acuática aguda del nitrobenceno.....	14
2.1.4.3. Toxicidad acuática crónica del nitrobenceno	14
2.1.5. Biodegradación.....	15
2.1.5.1. Biodegradación de compuestos aromáticos.....	15
2.1.6. Tratamientos Biológicos (Biorremediación)	16

2.1.7. Degradación por bacterias	16
2.8. <i>Serratia marcescens</i>	17
2.9. <i>Pseudomonas</i> spp.....	17
2.10. <i>Acinetobacter</i> spp.	17
2.2. Marco referencial.....	18
2.2.1. Estudio funcional de la vía de degradación.	18
2.2.2. Optimización de un consorcio bacteriano	18
2.2.3. Toxicidad y degradación microbiana	19
CAPÍTULO III MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.	31
3.1. Localización del área de estudio.....	32
3.2. Tipo de investigación	32
3.2.1. Experimental	32
3.3. Método de investigación	32
3.4. Fuentes de recopilación de información	32
3.4.1. Fuentes primarias.....	32
3.4.2. Fuentes secundarias	33
3.5. Materiales y equipos	33
3.5.1. Materiales de laboratorio.....	33
3.5.2. Material de oficina	33
3.5.3. Equipos de laboratorio	33
3.6. Reactivos	34
3.7. Diseño de la investigación	34
3.7.1. Diseño para la selección de cepas biodegradadoras.....	34
3.7.2. Diseño para la determinación el grado de tolerancia	35
3.8. Manejo del experimento.....	35
3.8.1. Selección de cepas biodegradadoras	35
3.8.2. Conservación de las cepas bacterianas.....	36
3.8.3. Medios y condiciones de cultivo empleados para <i>Pseudomonas</i>	36
3.9. Pruebas bioquímicas	37
3.9.1. Prueba de fósforo.....	37
3.9.2. Prueba de potasio	37
3.9.3. Prueba de ureasa	37
3.9.4. Prueba de catalasa.....	38
3.10 Elaboración de árbol filogénico para agrupamiento de caracteres bioquímicos.....	38
3.11. Selección de bacterias tolerantes a nitrobenceno.....	38

3.12. Ensayo para cuantificar la curva de crecimiento	39
3.13. Análisis estadístico	39
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. RESULTADOS	41
4.1.1. Pruebas bioquímicas para la selección de las cepas idóneas	41
4.1.2 Agrupamiento por caracteres bioquímicos.	43
4.1.3. Selección de bacterias tolerantes a nitrobenceno	44
4.1.4. Grado de adaptación de Pseudomonas spp. a nitrobenceno para su biodegradación.....	45
4.1.5. Discusión.....	46
CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1. Conclusiones	40
5.2. Recomendaciones	40
CAPITULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
CAPITULO VII ANEXO	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte de COPs a larga distancia. (28) (26).....	13
Figura 2. Estructura química del Nitrobenceno.	14
Figura 3. Vía catabólica de nitrobenceno.	16
Figura 4. Selección de cepas por reacción en medios de cultivo para pruebas bioquímicas.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. ADEVA de ensayo de selección de la cepa idónea biodegradadoras de nitrobenceno.....	34
Tabla 2. ADEVA para determinación del grado de tolerancia.	35
Tabla 3. ADEVA para cuantificar la curva de crecimiento.	35
Tabla 4. Reacción de la degradación de compuestos.	41

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Determinación de bacterias con potencial en biodegradación de nitrobenceno”
Autor:	Peñañiel Jaramillo María Fernanda
Palabras clave:	Bacterias, biodegradación, nitrobenceno, pruebas bioquímicas, espectrofotometría
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2020
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>Las bacterias biodegradadoras de compuestos aromáticos se han descrito por su capacidad de reducir la contaminación y ayudar a la protección ambiental frente a agentes contaminantes que atenuan contra su entorno, así también efectúa una acción sinérgica para la preservación del medio ambiente. La presente investigación tuvo como objetivo seleccionar e identificar la cepa idónea con capacidad biodegradadora de nitrobenceno. La selección de bacterias se las clasificó por la característica morfológica y bioquímica dando valores de: (+) presencia, (++) presencia alta, (-) ausencia. Para el estudio de degradación de nitrobenceno, un diseño bloque completamente al Azar (DCA), con 12 tratamientos en 3 repeticiones con un control positivo (RE4) y negativo (<i>E. Coli</i>). Las bacterias biorremediadoras con mayores efectos en las diferentes pruebas bioquímicas (catalasa, fosfatasa, ureasa fueron Cha0, R4, PM 2/12, BO 3/8, PM 3/14, DICM GBF, DIC (1) TEMP, DIC Omg, CL0 Mg, DIC 4M, DIC 3 MBFA. El crecimiento mediante espectrofotometría a 600 nm confirmó el incremento celular en las cepas DICmgBF y GL3 con una absorbancia de 1,23 y 1,18 respectivamente. Las agrupaciones filogenéticas están divididas en 2 grupos con aproximaciones evolutivas altas el grupo a esta confirmado por, Cha0, R4, PM 2/12, BO 3/8, PM 3/14, DIC (1) TEMP, DICM CBF, DIC 3 MBF. El grupo 2 (B) se subdivide en B1 y B2 donde la primera agrupación corresponde DIC 4M, DIC Omg, CLa Mg y GL1. y la segunda agrupación GL3 y CP3 quienes fueron las cepas que mostraron mayor crecimiento en el medio de cultivo a 600 ppm de nitrobenceno</p>
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
URI:	

Introducción

Uno de los rasgos característicos de la sociedad moderna es la creciente emisión al ambiente de sustancias contaminantes, destacando aquellas que proceden de las actividades industriales, mineras, agropecuarias, artesanales y domésticas (1). El proceso de industrialización en las grandes urbes ha generado un desequilibrio de los ecosistemas, ocasionando un dramático impacto para el planeta y la calidad de vida del hombre, esta contaminación ambiental no sólo ha afectado a las regiones más industrializadas, sino que se ha transformando en un problema a nivel mundial (2).

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), son capaces de viajar en las corrientes de aire, tanto a cortas como a largas distancias, puesto que son lo suficientemente volátiles como para evaporarse en el aire y/o se adhieren fácilmente a las partículas de polvo transportadas en él. Generalmente se evaporan con mayor facilidad en los lugares más cálidos, y caen con mayor facilidad en los lugares más fríos. Cuando los COP caen desde el aire, a veces aterrizan sobre la superficie de masas de agua, algunas veces sobre praderas, tundras, bosques o campos agrícolas. En todos estos lugares los COP entran a formar parte de la red alimentaria (3).

Dentro de los COPs encontramos compuestos nitroaromáticos, que son contaminantes importantes del medio ambiente, principalmente de origen antropogénico. Se producen como productos intermedios y en la fabricación industrial de tintes, explosivos, pesticidas, su toxicidad se ha demostrado en una amplia gama de organismos vivos (4). El uso en la producción del analgésico paracetamol (acetaminofén) representa un significativo mercado comercial para el nitrobenzeno (5).

Estas sustancias, además de estar presente en efluentes industriales, también están consideradas entre los tóxicos prioritarios por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA), pues son importantes contaminantes de suelos, agua subterránea, lodos y residuos sólidos. La remediación de aguas residuales que contienen estos compuestos es muy difícil, pues debido a su alta estabilidad se encuentran entre las sustancias más refractarias y generalmente son resistentes a las técnicas tradicionales de tratamiento tales como la degradación biológica (6).

Los suelos sanos son la clave para la seguridad alimentaria y un futuro sostenible, estos ayudan a mantener la producción de alimentos, mitigar y adaptarse al cambio climático, filtrar el agua, mejorar la resiliencia ante inundaciones y sequías, las prácticas agrícolas insostenibles reducen la materia orgánica del suelo y facilitan la transferencia de contaminantes a la cadena alimentaria. Con una población mundial que se proyecta supere los 9 000 millones en 2050, la seguridad alimentaria actual y futura dependerá de la capacidad para aumentar los rendimientos y calidad de alimentos utilizando los suelos disponibles (7).

La liberación de estos compuestos provoca grandes daños no sólo al medio ambiente, sino que afecta directamente al hombre, pues incluso a muy bajas dosis, producen cianosis, hepatotoxicidad, anemia e ictericia (8). La EPA recomienda que los niveles en lagos y corrientes de agua sean limitados a 17 partes por millón de nitrobenzeno (17 ppm) para prevenir posibles efectos en la salud por tomar agua o comer pescado contaminados con nitrobenzeno (9).

En el Acuerdo Ministerial de nuestro país AM 097-A no se encuentra información referida al nitrobenzeno, como estuvo establecida en la anterior Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua, donde los criterios de calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas y en aguas marinas o de estuario, establecía los límites máximos permisibles de nitrobenzeno en: 7 y 27 μgL^{-1} para agua marina y agua dulce respectivamente (10).

El valor referencial respecto al cual se evaluará una posible contaminación de suelo es de 0,1 mgKg^{-1} para hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) de origen natural y se considerarán como línea base (11). En el AM 097-A no se mencionan criterios de remediación o restauración, ni valores máximos permitidos de la sustancia nitrobenzeno.

Estos compuestos representan una amenaza para los seres vivos, por lo que se han desarrollado una serie de métodos para enmendar el impacto causado. Los métodos convencionales suelen ser costosos y pueden afectar de manera irreversible las propiedades del suelo, agua y de los seres vivos que en ellos habitan (1). Se han descrito algunos microorganismos capaces de mineralizar nitrobenzeno (NB), nitrofenoles, cloronitrofenoles, nitroanilinas, nitrobenzoatos, dinitrobenzoatos e incluso 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (8).

El objetivo de la presente investigación es evaluar el potencial de biodegradación del nitrobenceno mediante cepas bacterianas seleccionadas en condiciones *in vitro*. Los estudios de degradación se llevarán a cabo con diferentes aislamientos en intervalos de tiempo, las variables evaluadas ayudarán a determinar las cepas más eficientes para degradar nitrobenceno. Los resultados obtenidos se podrán utilizar para cualquier estudio de bioacumulación durante la biorremediación.

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Debido al uso excesivo de combustibles y otros productos derivados del petróleo durante las dos últimas décadas, la cantidad de compuestos aromáticos liberados al medio ambiente han aumentado de forma considerable. Estos compuestos aromáticos también se encuentran naturalmente en el medio ambiente, tales como la lignina, los aminoácidos y taninos. Otras fuentes de compuestos aromáticos incluyen los producidos por las actividades antropogénicas como la agricultura (insecticidas, herbicidas), la industria (disolventes, conservadores de maderas, detergentes), que conducen a aumentar la acumulación de estos compuestos en la naturaleza (12) (13).

El nitrobenceno en niveles elevados ejerce un impacto negativo, causando problemas teratógenos en las personas, afectación a la biodiversidad por la contaminación ambiental de este compuesto. La presencia de estos compuestos en el ambiente genera algunos problemas importantes como son la contaminación de aguas subterráneas y superficiales, selección del apropiado tratamiento de aguas residuales y diversos efectos tóxicos en humanos (12).

Según el Acuerdo Ministerial 142, el Nitrobenceno (I,T) es considerado como una sustancia química peligrosa y está asignado en el Anexo A, Listado No.3: Listado Nacional de Sustancias Químicas Peligrosas de Toxicidad Crónica con el N° RP U169 y N° CAS 98-95-3 (14). La mayoría de los compuestos que contienen nitrobenceno se usan para fabricar anilina, poliuretano, aceites lubricantes, tintes, drogas, pesticidas y caucho sintético (9).

La contaminación del suelo provoca una reacción en cadena, que altera la biodiversidad del suelo, reduciendo la materia orgánica que contiene y su capacidad para actuar como filtro. También se contamina el agua almacenada en el suelo y el agua subterránea, provocando un desequilibrio de sus nutrientes (7), en referencia a estas precauciones, el nitrobenceno se debe mantener alejado de los desagües, aguas superficiales y subterráneas, también retener y eliminar el agua de lavado contaminada, en cuanto a la información pertinente para el tratamiento de las aguas residuales, recomienda no tirar los residuos por el desagüe y evitar su liberación al medio ambiente (15). Debido a que la sustancia es nociva para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos, se aconseja firmemente impedir que el producto químico se incorpore al ambiente (16).

No existe información disponible sobre efectos del nitrobenzeno en la reproducción y desarrollo en humanos, como defectos congénitos o efectos embriotóxicos, por el contrario estudios en animales con exposición por inhalación y vía oral, evidencia efectos reproductivos, incluida disminución de fertilidad, reducción del peso testicular y poca producción de esperma (17).

Con respecto a las indicaciones de peligro, el nitrobenzeno se considera tóxico en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. Se sospecha que provoca cáncer y que puede perjudicar la fertilidad, además que provoca daños en los órganos (sangre) tras exposiciones prolongadas o repetidas (15). La exposición ocupacional puede ocurrir en fábricas que producen o usan nitrobenzeno para producir otros productos, aunque la exposición puede ocurrir también para aquellas personas que viven cerca de un sitio de desechos donde se ha encontrado nitrobenzeno dispuesto o cerca de una planta de fabricación o procesamiento (9).

Diagnóstico

Las ingentes cantidades de nitrobenzeno liberan toxinas que suponen un importante riesgo en las personas para la salud, las enfermedades respiratorias se han convertido en la primera causa de muerte en las zonas rurales y la cuarta en las ciudades. En los entornos ecológicos existe un efecto antagónico a diferentes especies naturales evitando su desarrollo biológico.

A pesar de que se han hecho compromisos para maximizar los beneficios y minimizar la huella del proceso de industrialización, distintas sustancias peligrosas continúan siendo liberadas al medio ambiente en grandes cantidades y se encuentran en el aire, agua, suelo, alimentos y seres humanos, como sucede con los COPs, que afectan a varias regiones en el mundo (3).

También sucede que en las actividades industriales, mineras, agropecuarias, artesanales y domésticas (1), se realizan prácticas de manejo inadecuadas de sustancias químicas peligrosas, como el nitrobenzeno, pues la desinformación de normativas ambientales, conduce al vertido de residuos por el desagüe y con esto su liberación al medio ambiente, sin ejecutar ningún tipo de tratamiento a las descargas de aguas residuales, debiendo considerarse la utilización de equipos de protección adecuados (incluido el equipo de protección personal) con el fin de evitar toda posible contaminación de la piel, los ojos, la ropa y evitar respirar los vapores/aerosoles (15).

Esto conduce a un sin número de problemáticas: la incidencia de enfermedades en humanos y animales (cancerígenas, intoxicaciones y perjudicando a la fertilidad) (8), a nivel de ecosistemas una pérdida de los mismos, con efectos nocivos en organismos acuáticos (7), al producirse derrames en grandes cantidades se provoca contaminación por sustancias químicas en fuentes hídricas tanto superficiales como subterráneas y una difícil remediación de aguas residuales (12).

Pronóstico

Los COPs, proyectan amenazas tan importantes a la salud y al entorno, que, si no se adoptan medidas inmediatas destinadas a restringir, eliminar su producción, utilización, emisión, almacenamiento, el planeta se verá gravemente afectado, de acuerdo a varios estudios se describen los efectos negativos que producirá el cambio climático en el comportamiento y destino de los COPs en el medio ambiente.

El incremento de vertidos de sustancias químicas peligrosas de forma incontrolada liberadas a la biosfera, contribuyen a la disminución de flora y fauna acuática, amenazando la pérdida de calidad de los suelos y por consiguiente inseguridad alimentaria, degradación de la calidad del agua para consumo humano, riesgos a la salud por el aumento en la incidencia de enfermedades en humanos y animales entre otros.

La contaminación ambiental con compuestos COPs y específicamente con compuestos nitroaromáticos ha generado la necesidad de buscar nuevos horizontes en el tema de la descontaminación, es importante además poder realizar estudios para seleccionar bacterias con potencial degradador de nitrobenceno y aplicarlos en futura biorremediación.

1.1.2. Formulación del problema

El mundo sufre grandes problemas de contaminación, las medidas de mitigación hacia el nitrobenceno carecen de información científica. Los factores abióticos y bióticos son afectados, entre ellos están: terrenos agrícolas, forestales, acuíferos, ambiente, etc. Los ecosistemas se empobrecen y las pérdidas ecológicas son cada vez mayor por efecto del nitrobenceno. La utilización de microorganismos del género *Pseudomonas* reducen la contaminación de este compuesto ayudando a la preservación del ecosistema para un ambiente más saludable en los seres vivos. ¿Cómo la aplicación de bacterias con potencial de degradación de productos xenobioticos incide en la biodegradación de nitrobenceno a nivel *in vitro*?

1.1.3. Sistematización del Problema

- ¿Cómo influirá la aplicación de bacterias del género *Pseudomonas* spp? en medios de cultivo contaminado de nitrobenceno?
- ¿Cuál tratamiento tendrá una mayor concentración celular en el tiempo de estudio tomando en consideración el efecto de las *Pseudomonas* spp en las variables a estudiar?
- ¿Se puede ejercer un control biológico eficiente mediante la aplicación de las *Pseudomonas* spp en medio contaminado con nitrobenceno?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Determinar la capacidad de biodegradación de nitrobenceno mediante la aplicación de *Pseudomonas* spp a nivel *in vitro*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Seleccionar la cepa idónea de bacterias biodegradadoras de nitrobenceno.
- Determinar el grado de tolerancia de *Pseudomonas* spp. en nitrobenceno.
- Cuantificar la curva de crecimiento de *Pseudomonas* spp. para biodegradación de nitrobenceno.

1.3. Justificación

La contaminación es un entorno que cada vez crece a nivel mundial, la industrialización tiene un mayor porcentaje de interacción con el medio ambiente, en este contexto el efecto nocivo del nitrobenzeno es mayor. El uso de microorganismos del género *Pseudomonas* posibilita una nueva alternativa para la mitigación de componentes aromáticos de toxicidad alta. Las ventajas del uso de microorganismo es el crecimiento elevado en menor cantidad de tiempo, esta cualidad ayuda en efecto a descontaminar lugares con contaminación de nitrobenzeno en menor tiempo.

La selección de bacterias del género *Pseudomonas* permite evaluar la eficiencia del microorganismo frente a compuestos aromáticos de alta toxicidad, la generación de curvas de crecimiento nos ayuda a referenciar la actividad metabólica del microorganismo en estudio.

El uso de *Pseudomonas* a nivel in vitro tiene gran importancia en los distintos trabajos investigativos. La falta de información sobre bacterias con capacidad biorremediadora de nitrobenzeno permite generar nuevas interrogantes sobre su comportamiento en descontaminación.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA
INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual

2.1.1. Compuestos orgánicos persistentes

La eficiencia de eliminación de compuestos orgánicos persistentes fue entre 75 y 85% cuando aguas residuales fueron tratadas solo por proceso aeróbico, mientras el proceso acidogénico-aeróbico resultó más del 95% (6). La aparición de partículas de plástico en el medio ambiente acuático ha generado una enorme preocupación en los últimos años. Los comportamientos de sorción de compuestos orgánicos nocivos por partículas plásticas pueden aumentar sus concentraciones en varios órdenes de magnitud que influyen en su transporte global en el medio marino (7).

La principal ventaja del proceso de dos etapas descrito es que la reducción del nitrobenzeno mediante el pretratamiento anaeróbico reduce drásticamente la emisión mediante la eliminación durante el tratamiento aeróbico (7). Los contaminantes orgánicos persistentes, es decir, compuestos orgánicos tóxicos de larga duración, como los PCB y las dioxinas que han llegado al medio ambiente, constituyen el tema de un programa de investigación lanzado en 1991/92 por la Agencia Sueca de Protección Ambiental de acuerdo a (8).

Las mediciones de contaminantes orgánicos persistentes (POP) en el aire y la deposición se han llevado a cabo en sitios costeros y marinos en la costa oeste sueca, las mediciones mostraron una deposición continua de COP, aquí representada por PAH, PCB y HCH, en la superficie del mar del Skagerrak, sin embargo los flujos de deposición también pueden verse afectados por fuentes locales (9).

2.1.2. Benceno

El benceno se deriva de los combustibles fósiles, particularmente el petróleo, y la reforma de alcanos de cadena lineal, así como de la combustión incompleta en volcanes, humo de cigarrillos e incendios forestales, es un contaminante ambiental orgánico ubicuo, altamente tóxico y cancerígeno, la exposición acumulativa al benceno de 400 ppm-años es equivalente a una exposición media anual de 10 ppm durante una vida útil de 40 años; 10 ppm es el estándar actualmente exigible en los Estados Unidos para la exposición laboral al benceno (10).

2.1.3. Mecanismo de transporte de un COP

El mecanismo de transporte planetario de un COP depende de la temperatura; en un proceso conocido como “efecto saltamontes” o “grasshopping”(26) estos compuestos químicos “saltan” alrededor del planeta, en los lugares cálidos, se dejan llevar por el viento y las partículas de polvo, se precipitan en la tierra en lugares templados, luego se evaporan y siguen desplazándose. A medida que estas sustancias se alejan del Ecuador encuentran climas más templados con menos evaporación. El resultado es un desplazamiento general de los contaminantes hacia los polos y las zonas montañosas (27), como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Transporte de COPs a larga distancia. (28) (26).

2.1.4. Compuestos Nitroaromáticos

Existen un grupo de COPs denominados compuestos nitroaromáticos. Estos son liberados a la biosfera casi exclusivamente desde fuentes antropogénicas (30).

2.1.4.1. Nitrobenceno

Es un compuesto formado por un anillo aromático y sustituido en uno de sus carbonos con un grupo nitro, uno de los 50 químicos industriales que son producidos en mayor cantidad por Estados Unidos; en el año 1995 se produjeron sobre 720000 toneladas (32), contiene 100% de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV) (20), su fórmula $C_6H_5NO_2$, peso molecular: 123.1094 (33), conocido por los nombres comerciales Benceno, nitro-, Esencia de Mirbane,

Esencia de Myrbane o Aceite de Mirbane (34), éste se obtiene por la nitración del benceno con una mezcla de agua, ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados, denominada mezcla sulfonítrica o simplemente mezcla ácida, su producción es uno de los procesos más peligrosos realizados en la industria química debido a gran exotermicidad de la reacción ($\Delta H = -117 \text{ kJmol}^{-1}$) (35).

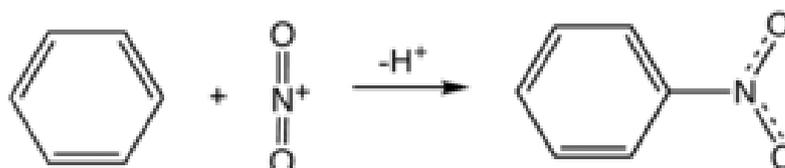


Figura 2. Estructura química del Nitrobenceno.

2.1.4.2. Toxicidad acuática aguda del nitrobenceno

Se denomina Dosis Letal Media (DL_{50}) a la dosis de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba (36). Los valores de DL_{50} son usados con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia, como en el caso del pez cebra (*Danio rerio*), con 92 mg L^{-1} en un tiempo de exposición de 96 h. El nitrobenceno es nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos (20).

La concentración efectiva media máxima (EC_{50}) se refiere a la concentración de un fármaco, anticuerpo o tóxico que induce una respuesta a medio camino entre la línea de base y la máxima después de un tiempo de exposición específico (36), como sucede con *Daphnia magna* con 27 mgL^{-1} en 48 h de exposición y para algas la reducción de la tasa de crecimiento (ErC_{50}) a 18 mg L^{-1} en 96 horas (20).

2.1.4.3. Toxicidad acuática crónica del nitrobenceno

El nitrobenceno puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático, en peces la DL_{50} es $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ a 23 días y la concentración más alta a la que no se observa efecto (NOEC) son 5 mg L^{-1} a 14 días, en microorganismos el crecimiento (CEbx) 20% un valor de 1000 mg L^{-1} a 30 minutos (20).

2.1.5. Biodegradación

Cuando se habla de biodegradación, se habla de la remoción de compuestos tóxicos empleando una diversidad de organismos vivos, principalmente algas, bacterias y hongos, cada uno de estos con la capacidad de llevar a cabo el rompimiento de estructuras moleculares de compuestos orgánicos a través de la biotransformación en metabolitos menos complejos y la mineralización de los mismos (37).

2.1.5.1. Biodegradación de compuestos aromáticos

El tratamiento biológico o biorremediación, es el mejor proceso utilizado para la degradación de compuestos aromáticos mediante el empleo de organismos vivos, por ser un proceso de bajo costo y amigable con el ambiente. Ciertos organismos tienen la capacidad de degradarlos gracias a que contienen las enzimas degradativas involucradas en las rutas metabólicas de dichos compuestos (37) (38). En la degradación aromática, la clave es la ruptura del anillo bencénico (26). Este mecanismo requiere en su mayoría la presencia de moléculas de oxígeno para iniciar el ataque enzimático al anillo aromático.

La ruta típica para metabolizar fenol es hidrolizando el anillo benceno para formar catecol y después abrir el anillo por orto o meta oxidación y seguir rutas específicas de cada organismo (39). Los hidrocarburos aromáticos son biotransformados en metabolitos menos complejos, y a través de la mineralización, son transformados en H₂O y CO₂ (procesos aeróbicos) o en CH₄ (procesos anaerobios). En estudios realizados anteriormente, sugieren que compuestos con menor peso molecular tienden a ser degradados en mayor cantidad en comparación con aquellos de mayor peso molecular (40) (37).

Por otro lado, la capacidad del organismo para la degradación de compuestos es caracterizado por diferentes variables del medio (37), como: Naturaleza química y concentración del compuesto degradado: Grado de toxicidad que influencia en el crecimiento de la cepa; Condiciones del cultivo: Concentración inicial de células, oxígeno disuelto, temperatura y demás factores fisicoquímicos; Cambios en: pH, temperatura, concentración de sustrato y adición de otras fuentes de carbono (40); Características cinéticas de crecimiento microbiano: Grado específico de crecimiento (μ), constante de inhibición (K_s), coeficiente de rendimiento (Y), rango de degradación (Q) (41).

2.1.6. Tratamientos Biológicos (Biorremediación)

Esta técnica utiliza el metabolismo de diferentes microorganismos para utilizar diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y de energía, con el fin de degradar o transformar los contaminantes a productos metabólicos inocuos o de menor toxicidad (42) (37).

2.1.7. Degradación por bacterias

La mayoría de los microorganismos capaces de degradar estos compuestos son aislados de suelos o sedimentos contaminados (43). Existen microorganismos, entre ellos tres especies de *Pseudomonas*, conocidas por su habilidad de emplear compuestos aromáticos como única fuente de carbono y que son citados repetidamente en la literatura por poseer una notable capacidad de degradar gran cantidad de compuestos aromáticos en concentraciones considerables y en tiempos relativamente cortos (37) (41). Dentro de los organismos con capacidades degradadoras, las bacterias han sido las más estudiadas y frecuentemente utilizadas en estrategias de biorremediación (44) (45) (46) (47).

Un gran número de microorganismos con capacidades degradadoras han sido aislados y caracterizados. Se ha descrito la biodegradación de compuestos nitroaromáticos tanto por microorganismos aerobios como anaerobios (48). Los cultivos estrictamente anaeróbicos altamente enriquecidos, se ha descrito que el benceno es mineralizado de forma cooperativa por dos o más organismos diferentes, (45) se han identificado varias vías metabólicas aeróbicas para la degradación del benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), que son proporcionadas por dos sistemas enzimáticos (dioxigenasas y monooxigenasas). La monooxigenasa ataca al metilo o etilo del anillo aromático, que posteriormente se transforman por varias oxidaciones en los correspondientes pirocatecoles sustituidos o fenilglioxal, respectivamente y la dioxigenasa ataca el anillo aromático con la formación de compuestos 2-hidroxi-sustituidos.

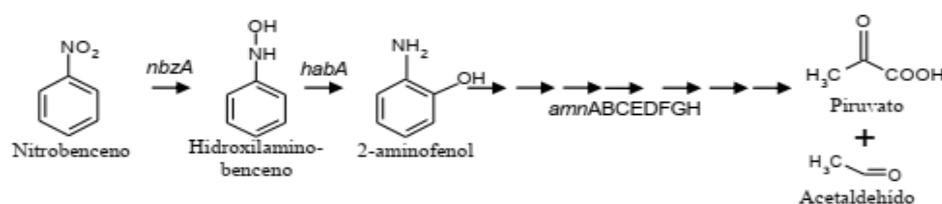


Figura 3. Vía catabólica de nitrobenceno.

2.8. *Serratia marcescens*

Es una bacteria gramnegativa en forma de bastón con una temperatura de crecimiento óptima de 28 °C, posibilita la solubilización de fosfato mineral de *S. marcescens* rsc-14 en un medio químico que contenga fosfato insoluble. Varias enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión peroxidasa, y el glutatión reducida producida por RSC-14 pueden permitir que las plantas toleren y desintoxiquen Cd, las enzimas antioxidantes también pueden contribuir colectivamente al alivio del estrés oxidativo causado por la acumulación intracelular de Cd, (46) (47), se aislaron de lodos contaminados con nitrobenceno tres cepas bacterianas, *Arthrobacter* sp. NB1, *Serratia* sp. NB2 y *Stenotrophomonas* sp. NB3 con potencial degradador de nitrobenceno a una concentración inicial de 400 mg / L, el cultivo mixto de estas cepas podría mejorar la degradación del NB en comparación con el monocultivo.

2.9. *Pseudomonas* spp

Pseudomonas pseudoalcaligenes es capaz de usar NB como única fuente de energía al carbono y nitrógeno, e indica que la vía catabólica implica la reducción de nitrobenceno a nitrosobenceno y luego a hidroxilaminobenceno (48); Cada uno de estos pasos requiere 1 mol de NADPH. Se demostró que el canal de drenaje contaminado y tres sitios río abajo eran similares, porque tenían bacterias del grupo Betaproteobacterias, principalmente agrupados en Comamonadaceae, como el grupo dominante de bacterias, y todos tenían Firmicutes, principalmente como *Clostridium* spp. Estos resultados sugieren que estos dos últimos grupos de bacterias pueden desempeñar funciones potenciales en la degradación y desintoxicación de nitrobenceno en los entornos de ríos contaminados actuales (49).

2.10. *Acinetobacter* spp.

El NB se degradó como único recurso de carbono y nitrógeno por parte de *Micrococcus luteus*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Comamonas* sp., *Acinetobacter* sp. y *Rhodococcus* sp. en el lodo granular aeróbico cultivado en el reactor SBR y no se inhibió por la concentración de nitrobenceno de hasta 600 mg/L(50). El tiempo de aireación tiene un efecto significativo en la eliminación de nitrobenceno, especialmente a menos de 15 h. La carga más alta de nitrobenceno fue de 0,33 kg / (m³ d) logrando la eliminación completa. El tiempo de alimentación y la carga de choque tuvieron poco efecto sobre la eliminación de NB.

2.2. Marco referencial

2.2.1. Estudio funcional de la vía de degradación de 2-aminofenol presente en *Burkholderia xenovorans* lb400 y sus posibles aplicaciones en biotecnología ambiental (Valparaíso-Chile 2009).

Este estudio constituye un aporte a futuras aplicaciones en biotecnológica ambiental de procesos de descontaminación de compuestos nitroaromáticos. *Burkholderia xenovorans* LB400 es una de las diez bacterias más importantes descritas para la degradación de contaminantes orgánicos persistentes (COPs). Su genoma muestra la presencia de un número importante de genes catabólicos asociados a la degradación de compuestos aromáticos. Dentro de los genes catabólicos, la cepa LB400 posee genes relacionados con la degradación de compuestos nitroaromáticos. Uno de los compuestos nitroaromáticos de especial interés en términos ambientales es el 2-aminofenol, cuya vía de degradación codificada por los genes *amn* está presente en *B. xenovorans* LB400 (52).

2.2.2. Optimización de un consorcio bacteriano para la degradación de nitrobenceno (Zhejiang-China 2011).

Tres cepas bacterianas, *Arthrobacter* sp. NB1, *Serratia* sp. NB2 y *Stenotrophomonas* sp. NB3 se aislaron del lodo contaminado utilizando nitrobenceno como única fuente de carbono y nitrógeno. Se observó que las tres cepas podían degradar el nitrobenceno a 400 mg / L. La concentración inicial y el cultivo mixto de estas cepas podrían mejorar la degradación de nitrobenceno en comparación con el monocultivo. El diseño de la mezcla se utilizó para ajustar las proporciones de cada cepa y la proporción óptima de tamaño de inoculación fue NB1:NB2:NB3=4:4:5, donde el porcentaje de degradación de nitrobenceno fue dos veces mayor que para la cepa simple. Los resultados del diseño de Plackett-Burman indicaron que Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} tuvieron un resultado efecto positivo, sobre la degradación del nitrobenceno, mientras que Cu^{2+} y Co^{2+} tuvieron un efecto negativo sobre él (53).

2.2.3. Toxicidad y degradación microbiana de nitrobenceno, monocloronitrobencenos, polinitrobencenos y pentacloronitrobenceno (2014).

El nitrobenceno y sus derivados (NBD) son compuestos altamente tóxicos que han sido liberados al medio ambiente por actividades antropogénicas. Muchas bacterias y hongos se han caracterizado por su capacidad para degradar los NBD. También se ha estudiado la caracterización bioquímica y molecular de la degradación microbiana de los NBD. los perfiles de toxicidad y degradación de nitrobenceno, monocloronitrobencenos, polinitrobencenos y pentacloronitrobenceno. Esta revisión aumentará nuestra comprensión actual de la toxicidad y la degradación microbiana de los NBD (54).

CAPÍTULO III
MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1. Localización del área de estudio

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez”, ubicado en la ciudad de Quevedo, provincia de Los Ríos, Km. 1^{1/2} de la vía Quevedo – Santo Domingo de los Tsáchilas. Sus coordenadas geográficas son 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

3.2. Tipo de investigación

3.2.1. Experimental

El estudio posee las cualidades de una investigación de tipo experimental, puesto que se realizó la manipulación directa de las variables en estudio: tipo de microorganismos caracterizados de suelo contaminado con pesticidas. A través del análisis en laboratorio se procedió a la selección de los microorganismos y clasificación de los mismos, empleando todos los estándares nacionales e internacionales que rigen la microbiología del suelo y del medio ambiente.

3.3. Método de investigación

En esta investigación se aplicó el método inductivo, deductivo, experimental y bibliográfico con el fin de seleccionar bacterias con potencial en biodegradación de nitrobenzeno.

3.4. Fuentes de recopilación de información

3.4.1. Fuentes primarias

En las fuentes primarias se usaron libros, revistas científicas y de entretenimiento, periódicos, diarios, documentos oficiales de instituciones públicas, informes técnicos y de investigación de instituciones públicas o privadas, patentes y normas técnicas para optimizar los recursos de la investigación, además se trató en lo posible de reducir los riesgos dentro del área de trabajo, durante el monitoreo y el procedimiento a verificar en el laboratorio.

3.4.2. Fuentes secundarias

En las fuentes o informaciones secundarias se empleó enciclopedias, antologías, directorios, libros o artículos que interpretan otros trabajos que validen todos los procesos de la investigación, como las pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos y la fase de crecimiento en medios de cultivo selectivos.

3.5. Materiales y equipos

3.5.1. Materiales de laboratorio

- ❖ Puntas blancas de micro-pipeta (0.2-10 μ l)
- ❖ Puntas amarillas de micro-pipeta (2-20 μ l y 20-200 μ l)
- ❖ Puntas azules de micro-pipeta (100-1000 μ l)
- ❖ Papel toalla
- ❖ Papel filtro
- ❖ Juego de micro-pipetas (0.2-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l y 100-1000 μ l)
- ❖ Frascos Chopp de vidrio (500 ml)
- ❖ Tubos de Eppendorf (0.6 ml y 1.5 ml)
- ❖ Papel parafilm
- ❖ Cajas Petri
- ❖ Guantes quirúrgicos talla M
- ❖ Tijeras quirúrgicas

3.5.2. Material de oficina

- ❖ Cuaderno
- ❖ Computador
- ❖ Lapiceros
- ❖ USB pendrive

3.5.3. Equipos de laboratorio

- ❖ Nevera de -20 °C
- ❖ Balanza electrónica
- ❖ Campana extractora de gases

- ❖ UV transiluminador
- ❖ Cabina de flujo
- ❖ Cámara fotográfica
- ❖ Baño María
- ❖ Centrífuga
- ❖ Congelador -40 °C
- ❖ Vortex
- ❖ Horno Microondas
- ❖ Cámara de flujo laminar
- ❖ Autoclave
- ❖ Agitador
- ❖ Estufa
- ❖ Destilador de agua
- ❖ Microscopio

3.6. Reactivos

El compuesto aromático nitrobenzeno se obtuvo comercialmente de J.T. Baker Chemical Co, cuya pureza del compuesto es del > 98%. Se preparó una solución de nitrobenzeno 1 mM en acetona (1 % v/v concentración final en solución).

3.7. Diseño de la investigación

3.7.1. Diseño para la selección de cepas biodegradadoras

Para la selección de las cepas con potencial de biodegradación de nitrobenzeno se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con 14 tratamientos en tres repeticiones los cuales corresponden a las 12 cepas bacterianas más un control positivo y un control negativo. (Tabla 1).

Tabla 1. ADEVA de ensayo de selección de la cepa idónea biodegradadoras de nitrobenzeno.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	41
Tratamientos	13
Error	28

3.7.2. Diseño para la determinación el grado de tolerancia de *Pseudomonas* spp. en nitrobenceno

Se determinó el grado de tolerancia de las bacterias en estudio en medio contaminado con nitrobenceno, empleando un diseño completamente al azar (DCA) conformado por 5 tratamientos en tres repeticiones los cuales correspondieron a las 5 cepas bacterianas con potencial biodegradador de nitrobenceno (Tabla 2).

Tabla 2. ADEVA para determinación del grado de tolerancia.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	14
Tratamientos	4
Error	10

3.7.3. Diseño para cuantificar la curva de crecimiento de *Pseudomonas* spp. para biodegradación de nitrobenceno

Para la cuantificación de la curva de crecimiento por parte de las bacterias en estudio se empleó un diseño completamente al azar (DCA) considerando un único factor que correspondió a las cepas bacterianas, inoculadas en un medio de cultivo a una concentración de 600 ppm de nitrobenceno, conformando 5 tratamientos en tres repeticiones (Tabla 3).

Tabla 3. ADEVA para cuantificar la curva de crecimiento.

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	14
Tratamientos	4
Error	10

3.8. Manejo del experimento

3.8.1. Selección de cepas biodegradadoras

Para seleccionar las cepas con capacidad de degradación de nitrobenceno se realizaron pruebas bioquímicas basadas en la degradación de compuestos minerales y emisión de enzimas, las bacterias se incubaron por 24 horas en medio de cultivo King B antes de la realización de las pruebas bioquímicas para facilitar el crecimiento de la biomasa bacteriana.

En medio de cultivo mínimo M9 se inoculó las bacterias previamente crecidas en matraces con capacidad de 50 ml y se procedió a contaminar con 600 ppm de nitrobenceno luego se dejó incubar por 48 horas. Todas las bacterias que formaron parte de los ensayos fueron seleccionadas por su capacidad de crecimiento en condiciones de alta contaminación de nitrobenceno (600 ppm), y la reacción a las siguientes pruebas bioquímicas: Medio de cultivo Pikoskaya (fósforo), Medio de cultivo NBRIP (potasio), Prueba de Ureasa (nitrógeno), Prueba de catalasa (peróxido de hidrógeno).

Se realizó un registro fotográfico para determinar la reacción en base al cambio de tonalidad del medio y generación enzimática como la prueba de catalasa que reacciona por la adición de peróxido de hidrógeno, mostrando glóbulos concéntricos de forma acelerada al contacto con la bacteria.

3.8.2. Conservación de las cepas bacterianas

Para la conservación de las cepas bacterianas se dejó crecer a 28 °C durante 48 horas hasta mostrar turbidez en el medio, se esterilizaron criotubos en autoclave a 20 PSI durante 40 minutos para liberarlos de contaminantes, luego se llenó cada tubo con 800 microlitros de cultivo bacteriano y 200 de glicerol se mantiene en fase de adaptación durante 24 horas a -20 °C transcurrido este periodo se llevaron a ultra congelación para quedar conservadas durante un tiempo de 3 años.

3.8.3. Medios y condiciones de cultivo empleados para *Pseudomonas*

El medio mínimo utilizado para cultivar *Pseudomonas* fue el medio mineral M9 (49), que contiene; hidrógeno fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 50 mM, fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 22 mM, cloruro de sodio (NaCl) 85mM, cloruro de amonio (NH_4Cl) 7,5 mM. El medio de cultivo M9 se colocó en placas Petri, con las cepas bacterianas previamente incubadas por 48 horas sobre el medio contaminado. Las bacterias que mostraron crecimiento colonial en el medio de cultivo contaminado con 600 ppm de nitrobenceno fueron seleccionadas para los ensayos de absorbancia para determinar su grado de tolerancia al contaminante.

Como control positivo se utilizó la cepa *Pseudomona veronii* R4 la cual degrada NB y como control negativo se utilizó una cepa de *Serratia marcescens* la cual no posee la capacidad de degradarlo.

3.9. Pruebas bioquímicas

3.9.1. Prueba de fósforo

Para el ensayo de fósforo se utilizó el medio de cultivo Pikoskaya compuesto; glucosa 10 g/L, nitrato de potasio 5g/L, cloruro de potasio 0,2 g/L, sulfato de amonio 0,5 g/L, sulfato de magnesio 0,1 g/L, sulfato de manganeso trazas 0,1 g/L, purpura de bromocresol 0,125 g/L, agar 15 g/L, Ph $7,0 \pm 2$. Se procedió a evaluar 48 horas después de la incubación, el cambio de color del medio de cultivo fue el indicador de una reacción positiva.

3.9.2. Prueba de potasio

En esta prueba se empleó el medio de cultivo NBRIP compuesto por: Glucosa 10g/L, carbonato de calcio 3g/L, fosfato de potasio 2g/L, sulfato de magnesio 0,5g/L, cloruro de sodio 1g/L, Cloruro de potasio 0,2g/L, sulfato de amonio 0,1g/L, agar 25 g/L, Ph 6,8 g/L, purpura de brocrisol 0,003 g/L. Las cepas bacterianas fueron incubadas en tubos de ensayo de 10 ml por un periodo de 48 horas a 28 °C, el cambio de coloración es el indicativo que existe una degradación del compuesto.

3.9.3. Prueba de ureasa

Esta prueba está compuesta por: digerido pancreático de gelatina 1g/L, dextrosa 1g/L, cloruro de sodio 5g/L, fosfato de potasio 2 g/L, urea 20g/L, rojo fenol 0,012 g/L, Agar 15 g/L, ácido cítrico 2 g/L, Ph 6,8 a 25 °C. En cajas Petri con el medio agar urea se realizó la siembra mediante técnica del agotamiento de asa, incubado a 28°C durante 24 - 48 y 72 horas, el cambio de tonalidad del color ámbar claro inicial a un rosa intenso (fucsia). Las bacterias producen una alta cantidad de enzima en el medio de cultivo, motivo por el cual modifica su coloración a fucsia.

3.9.4. Prueba de catalasa

Fueron inoculados los microorganismos en cajas Petri que contenían agar nutritivo incubadas a 28°C durante 24 horas, luego del periodo de incubación se tomó una pequeña porción de la biomasa bacteriana en un cubre objeto y se adicionaron 3 microlitros de peróxido de hidrógeno para inducir la reacción enzimática lo cual produce la emisión de pequeñas burbujas en caso de ser positiva.

3.10 Elaboración de árbol filogénico para agrupamiento de caracteres bioquímicos

Se generó un árbol filogenético con el programa estadístico MEGA 6 agrupando todas las características bioquímicas de las bacterianas, luego se transformó en códigos binarios que permitieron la discriminación y agrupación de las mismas, cada grupo conformado se comparó con el crecimiento a 600 ppm de nitrobenceno para su selección.

La historia evolutiva se infiere utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron aplicando el método de unión de vecinos a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. Se eliminaron todas las posiciones que contienen vacíos y datos faltantes. Hubo un total de cinco posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6.

3.11. Selección de bacterias tolerantes a nitrobenceno

Se inocularon 20 ul de cultivo bacteriano en medio de cultivo contaminado con 600 ppm de nitrobenceno, durante 5 días a temperatura ambiente. Se mantuvieron en agitación constante para permitir la homogenización de la mezcla en un agitador orbital a 120 rpm, los datos de la longitud de onda se midieron empleando un espectrofotómetro con una calibración (*OD*_{600 nm}), se utilizaron cubetas plásticas desechables en las cuales en una cabina de flujo laminar se colocó con la ayuda de una micropipeta 1 ml de la muestra del medio incubado, adicionando un blanco sin la inoculación de bacterias.

3.12. Ensayo para cuantificar la curva de crecimiento de potencial de adaptación de nitrobenceno

A las cepas seleccionadas a partir del objetivo uno, se les realizó la curva de crecimiento mediante la determinación de O. D. y sometidas a pruebas de degradación con 600 ppm de nitrobenceno. Los estudios de laboratorio de biodegradación se llevaron a cabo en condiciones optimizadas, para evaluar cuantificar la curva de crecimiento del potencial de biodegradación de nitrobenceno de cepas aisladas.

En matraces se colocaron 20 ml de medio de cultivo líquido con el contaminante, se intubó en agitador orbital a 120 rpm a 26 °C por un lapso de 5 días. Se repitió este proceso para cada una de las bacterias en estudio. Los datos se tomaron cada 12 horas manteniendo las condiciones de incubación mencionadas anteriormente. Con los datos obtenidos en el espectrofotómetro se realizó la curva de crecimiento al contenido celular, expresada en días para cada una de las cepas estudiadas.

3.13. Análisis estadístico

Para la realización del procesamiento estadístico, las variables a evaluar fueron sometidas al análisis de varianza y a la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Para esto se utilizó el software estadístico Excel 2016 e Infostat 2019.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Pruebas bioquímicas para la selección de las cepas idóneas

Se comprobó la degradación de compuestos comunes en el suelo, entre los que se destaca el fósforo, determinado mediante la prueba Pikoskaya, mostrando alteraciones bioquímicas expresadas en el cambio de color del medio, a excepción de las cepas GL3 y GL1 que desplegaron reacciones negativas sin modificaciones en la colorimetría del medio de cultivo y crecimiento mínimo de colonias. En la reacción de potasio y ureasa existieron agrupaciones favorables y reacciones positivas superiores al 60% de las cepas evaluadas. La prueba de catalasa mostró reacción positiva para todas las cepas generando resultados favorables al 100%, luego de haber realizado las pruebas iniciales se procedió a comprobar el crecimiento a 600 ppm de nitrobenceno donde solo mostraron crecimiento las cepas GL3, DICMcBF, DICLOmg, CLO Mg y DIC3MBF que fue confirmado por espectrofotometría.

Tabla 4. Reacción de la degradación de compuestos.

Cepa	Potasio	Ureasa	Fosforo	Catalasa	Crecimiento 600 ppm
Cha0	++	++	+	+	-
R4	++	++	+	+	-
PM 2/12	++	++	++	+	-
BO 3/8	++	+	+	+	-
PM 3/14	++	++	+	+	-
GL3	-	-	-	+	+
GL1	+	-	-	+	-
CP3	-	-	+	+	-
DICMcBF	++	+	+	+	+
DIC(1)TEMP	++	+	+	+	-
DICLOmg	++	-	+	+	+
CLO Mg	++	-	+	+	+
DIC 4M	++	-	+	+	-
DIC 3 MBF	++	+	+	+	+

++ mayor crecimiento

+ crecimiento

- sin crecimiento

Las diferencias en las pruebas bioquímicas de las bacterias seleccionadas en el estudio, determinaron la capacidad para la solubilización de diferentes compuestos como fósforo, potasio, urea y producción de enzimas como catalasa. Una de las cepas bacterianas con el mayor potencial fue DICL0mg que mostró resultados favorables en todas las pruebas bioquímicas de degradación, destacando la asimilación del medio Pikoskaya para la degradación de fósforo en un 100 %.

Las cepas DIC3MBF y DICMcBF lograron degradar urea y producir la enzima ureasa, demostrando su potencial como degradadoras de compuestos nitrogenados y facilitadoras de amoníaco de fácil asimilación por organismos autótrofos como las plantas y algas. Las mismas cepas también produjeron cantidades mínimas de catalasa guardando relación con la eliminación del peróxido de hidrógeno, y denotando su función protectora extracelular.

La cepa GL3 no mostró resultados favorables en la producción de enzimas degradadoras de fósforo, potasio y urea, pero su reacción ante la producción de catalasa fue evidente y de gran potencial.

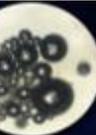
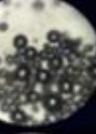
	FOSFORO	POTASIO	UREA	CATALASA
GL3				
DICL0mg				
DIC3MBF				
DICMcBF				
CLOmg				

Figura 4. Selección de cepas por reacción en medios de cultivo para pruebas bioquímicas de degradación.

4.1.2 Agrupamiento por caracteres bioquímicos.

El árbol de conglomerados inicial conformó 3 grupos constituidos por: Grupo A (Cha0, R4 PM2/12, BO 3/8, PM 3/8, DIC (1) TEMP, DICMCBF, DIC3MBF); Grupo B (DIC4M, DIC Omg, CLa Mg, GL1) y Grupo C (GL3, CP3). Cada uno de los grupos asociados al árbol de conglomerados guardan relación según las pruebas bioquímicas realizadas en los ensayos anteriores, una de las asociaciones más destacadas son las cepas GL3 y CP3 que fueron aisladas de suelos agrícolas y no presentaron reacción en las pruebas de potasio y ureasa. En la asociación del Grupo B todas presentaron reacción positiva a la degradación de fósforo mediante la producción de fosfatasa (Figura 5).

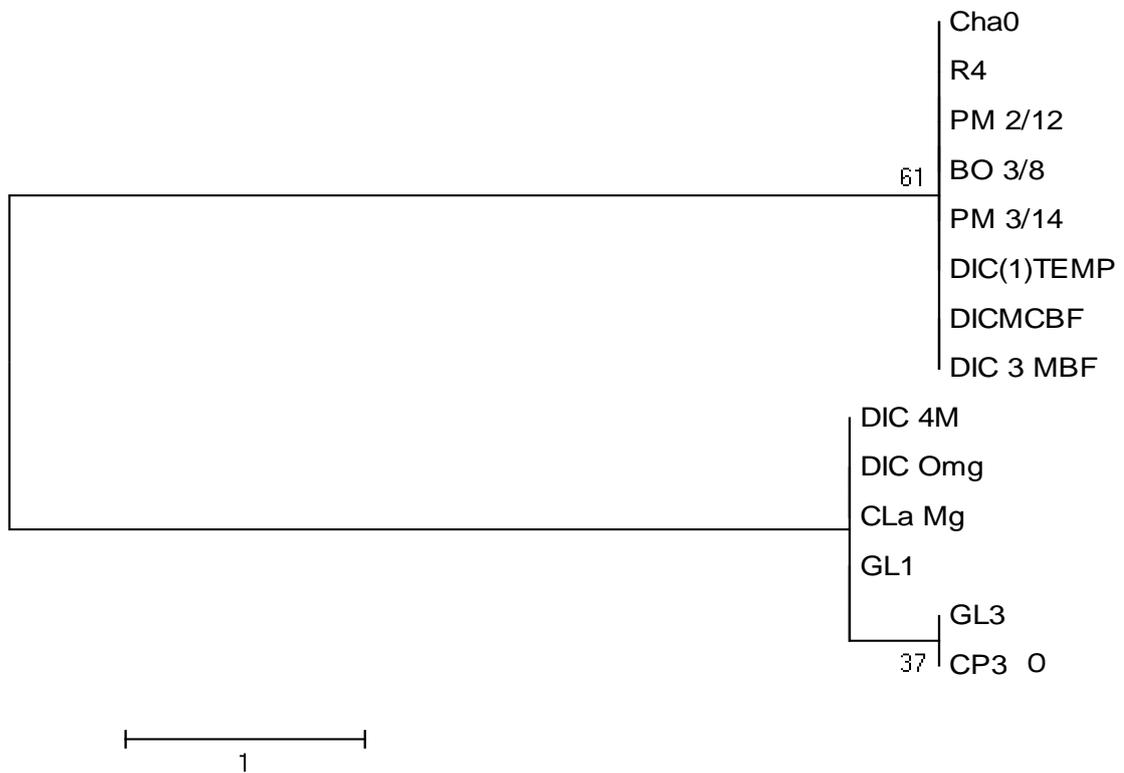


Figura 5. Análisis de conglomerados a caracteres bioquímicos por el método de Máxima Verosimilitud. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-22803.4545). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas.

4.1.3. Selección de bacterias tolerantes a nitrobenceno

El modelo de selección se enfatizó al crecimiento bacteriano expuesto a nitrobenceno mediante, confirmación del incremento celular por medio de valores de absorbancia y transmitancia obteniendo como resultado que las cepas DICMcBF y GL3 con mayor contenido de crecimiento celular a 1,23 y 1,18 OD (600nm), respectivamente. Las cepas DICLOmg, CLO Mg y DIC3MBF presentaron los promedios más bajos, esto permite una menor adaptabilidad al nitro benceno lo que condicionaría el crecimiento celular entre (0,130 a 0,309) OD (600nm). El resto de cepas en evaluación no mostraron crecimiento alguno revelando baja absorbancia que confirma la inhibición de crecimiento celular que no superan los 0,0513 OD (600nm) a 600 ppm nitrobenceno (Figura 6).

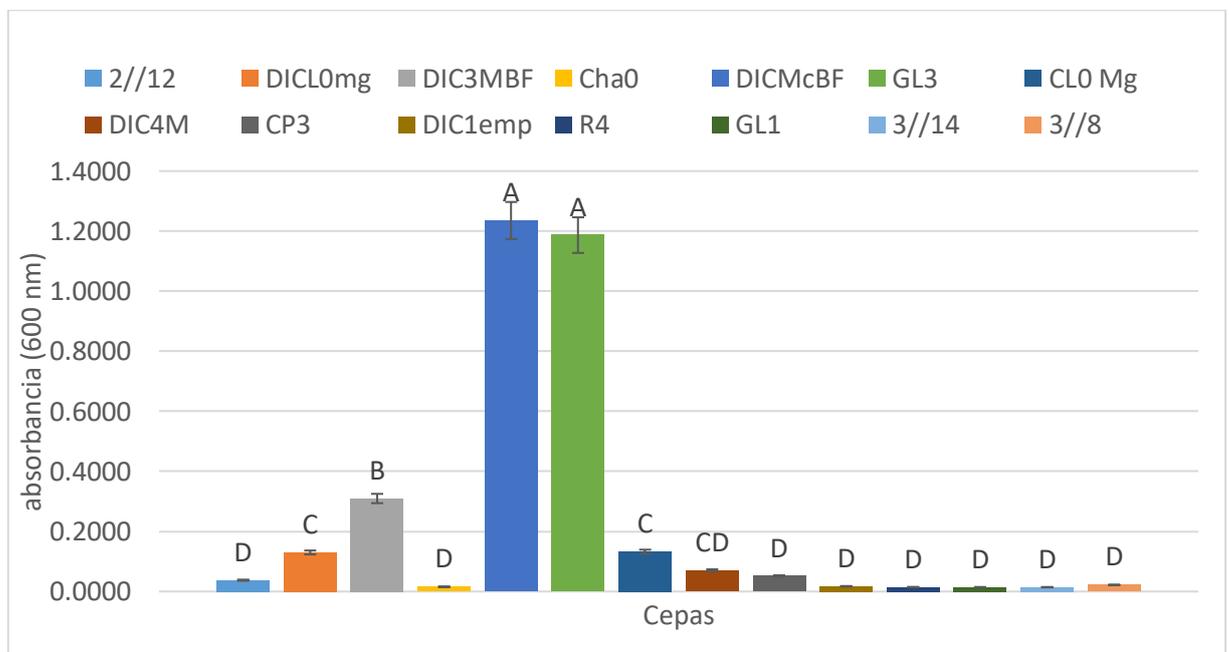


Figura 6. Grado de tolerancia al crecimiento bacteriano a exposición con nitrobenceno a 600 ppm en medio M9 por 5 días . Las barras de error indican \pm ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test de Tukey).

4.1.4. Grado de adaptación de *Pseudomonas* spp. a nitrobenceno para su biodegradación

La cuantificación al grado de adaptación al medio M9 contaminado con nitrobenceno, se determinó al crecimiento celular cada 12 horas durante 120 horas, para las cepas de mayor grado de tolerancia (DICMcBF, GL3, DICLOMG, y DIC3MBF). A los primeros resultado de adaptación de las células bacterianas a 12 horas, se verifica un incremento en el contenido celular de las cepas (GL3, DICLOmg, DICMcBF y DIC3MBF). El crecimiento al aumento del contenido celular prevalecen para las cepas (GL3, DICLOmg y DIC3MF) a las 36 horas. Es importante recalcar que la cepa DIC3MBF a las 60 horas, se verifica los puntos mayores de absorbancia lo que indicaría el mayor contenido celular por esta cepa, donde estaría captando nitrobenceno y siendo éste empleado como fuente de carbono para consumo y crecimiento de la bacteria.

Los valores a los parámetros fijados por absorbancia descienden a las 72 horas, para la cepa DIC3MBF a (OD 1,3400), esto refleja la disminución del contenido celular llegando a su fase estacionaria. El caso para las cepas (GL3, DICLOmg, DICMcBF) su fase estacionaria al mayor contenido celular logra establecerse entre (0,873 y 1,443). Este resultado revelaría el consumo y adaptación al medio M9 con única fuente de carbono al nitro benceno, donde los índices a incremento de la masa celular no se incrementan llegando a su fase estacionaria para todas las cepas hasta 120 horas de muestreo registrándose entre (1,281 y 0.977) (Figura 7).

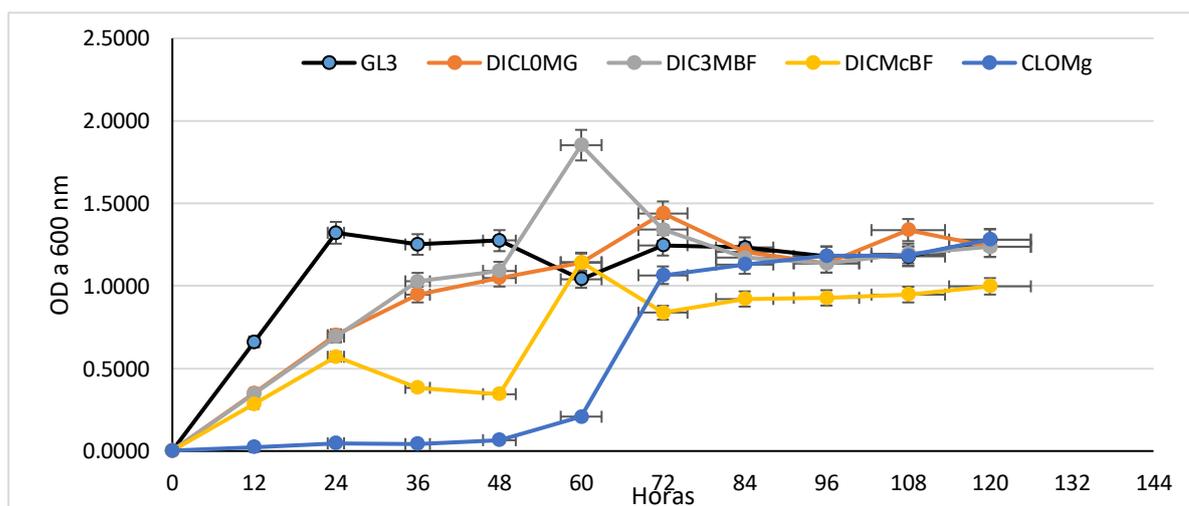


Figura 7. Curva de crecimiento al contenido celular de las cepas (DICMcBF, GL3, DICLOMG, y DIC3MBF) en medio M9 con nitro benceno por 120 horas.

4.1.5. Discusión

Las bacterias con capacidad biodegradadora de compuestos organofosforados fueron seleccionadas en esta investigación. Las pruebas bioquímicas realizadas a las distintas cepas de bacterias del género dieron como positivo, se aislaron bacterias con capacidad biorremediadora de suelos con nitrobenceno y dieron como resultado valores positivos en pruebas de catalasa, proteasa, ureasa en las cepas *Pseudomonas* spp. *Serratia* spp. *Arthrobacter* spp, esto se atribuye a la actividad metabólica de las bacterias para disponer complejos proteicos, carbono, lípidos en su alimentación (55). La catalasa es una enzima común que se encuentra en casi todos los organismos vivos, tiene una de las mayores pérdidas de todas las enzimas, ya que posee la capacidad de descomponer más de un millón de moléculas de nitrobenceno y otros compuestos (56).

Los microorganismos de *Arthrobacter* spp, *Acinetobacter*, *Enterobacter* producen la enzima ureasa para secuestrar metales pesados y contaminante de suelos, debido a esta reacción enzimática, el pH del suelo aumentó y se produjo carbonato, lo que da como resultado la mineralización de los iones de metales pesados solubles presentes en el agua del suelo y su conversión final en carbonatos (57). Las bacterias seleccionadas mostraron altas tasas de eliminación, que van desde 88% a 99% de metales pesados después de la incubación durante 48 h.

Algunas especies bacterianas tienen potencial de mineralización y solubilización para el fósforo orgánico e inorgánico, respectivamente(58). La actividad solubilizadora del fósforo está determinada por la capacidad de los microbios para liberar metabolitos como los ácidos orgánicos, que a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo quelan el catión unido al fosfato, siendo este último convertido a formas solubles.

Los mayores valores de absorbancia fueron las cepas DICMcBF y GL3 con datos promedio de 1,23 y 1,18, seleccionando cepas del género *Acinetobacter*, *Comamonadaceae*, *Pseudomonas* y *Thauera* obtuvieron valores de espectrofotometría entre 0.7 y 0.8 la mejora de la eliminación de nitrobenceno mediante la optimización de las condiciones de sedimento para un mejor crecimiento de las *Proteobacterias* y *Firmicutes indígenas* (59). En condiciones aeróbicas, la tasa de degradación tanto de nitrobenceno como de p-CNB fue solo del 20%,

esto muestra que la comunidad bacteriana era estable en condiciones anaeróbicas y los microorganismos, incluido el NBA-1, eran más resistentes al entorno adverso(60).

La cepa de bacteria NB1 existió como la especie de microorganismo indígena dominante en el agua subterránea contaminada con nitrobenceno en la ciudad de Jilin (61). Esta cepa podría ingerir nitrobenceno como la única fuente de nutrición de carbono y nitrógeno en condiciones aeróbicas. Las tecnologías combinadas de biorremediación in situ de rociado de aire y bioaugmentación podrían eliminar aproximadamente el 89.56% de nitrobenceno del agua subterránea, con un pequeño cambio en la biodiversidad.

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Las altas concentraciones de nitrobenceno en el medio de cultivo inhiben el crecimiento bacteriano lo que permite la selección de las cepas adaptadas a este contaminante y que tienen la capacidad de usarlo como fuente de energía.
- La cepa de mayor crecimiento fue GL3 desde las 24 horas de evaluación constante llegando a su fase de mayor crecimiento a las 72 horas después de inoculación.
- Todas las cepas en el tratamiento de crecimiento a 600 ppm de nitrobenceno mostraron crecimiento favorable hasta las 96 horas después de la inoculación.

5.2. Recomendaciones

Evaluar distintas dosis de nitrobenceno para determinar el potencial degradador de estas bacterias en otros ensayos.

Debido a que las bacterias que formaron parte de esta investigación fueron seleccionadas por su capacidad de crecimiento en condiciones de alta contaminación de nitrobenceno (600 ppm), podrían ser aplicadas en nuevos ensayos de biorremediación.

Se recomienda la aplicación de bacterias para la mitigación de los efectos nocivos del nitrobenceno, la eficacia del tratamiento dependerá de la constancia de la aplicación.

CAPITULO VI
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BIBLIOGRAFÍA:

1. Aziz, M. A., Ng, W. J., & Zhou, X. J. Acidogenic-aerobic treatment of a wastewater containing nitrobenzene. *Bioresource technology*. 1994; p. 37-42
2. Wang, J., Liu, X., & Liu, G. Sorption behaviors of phenanthrene, nitrobenzene, and naphthalene on mesoplastics and microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019; p. 12563-12573
3. Jansson, B., Andersson, R., Asplund, L., Litzen, K., Nylund, K., Sellström, U., & Olsson, M. Chlorinated and brominated persistent organic compounds in biological samples from the environment. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 1993; p. 1163-1174.
4. Brorström-Lundén, E. Atmospheric deposition of persistent organic compounds to the sea surface. *Journal of Sea Research*. 1996; p. 81-90.
5. Aburto, A., Fahy, A., Coulon, F., Lethbridge, G., Timmis, K. N., Ball, A. S., & McGenity, T. J. Mixed aerobic and anaerobic microbial communities in benzene-contaminated groundwater. *Journal of applied microbiology*. 2009; p. 317-328.
6. Çinar Ö. Biodegradation of central intermediate compounds produced from biodegradation of aromatic compounds: *Bioprocess and Biosystems Engineering*; 2004.
7. Shrivastava R, Phale PS. Biodegradation of mono-aromatic compounds by bacteria. *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, Springer Science + Business Media: Satyanarayana T et al. (eds.); 2012.
8. Ministerio del Ambiente Ecuador. Listado Nacional de Sustancias Químicas Peligrosas, Desechos Peligrosos y Especiales. 2012 Octubre 11.
9. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, ATSDR. Reseña Toxicológica del Nitrobenzeno. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. Atlanta, GA; 1990.
10. FAO. Los suelos sanos son la clave para la seguridad alimentaria y un futuro sostenible. *La Jornada*. 2018 Diciembre: p. 22.
11. Roth C. Ficha de Datos de Seguridad. Nitrobenzeno. 2016 Agosto 16.
12. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. [Online].; 2019. Available from: <https://www.insst.es/home>
13. TOXNET. Red de datos de Toxicología, HSDB (Banco de datos de sustancias peligrosas). 2019.

14. Weinberg J. Guía para las ONG sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes. (COP) MplmdpdllshyemadlCOP, editor. México: O; 2009.
15. Padmavathiamma PK, Li LY. Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants. Water, Air, & Soil Pollution; 2007.
16. Higson F. Adv. App. Microbiol; 1992.
17. Navia R, Seeger M. Biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes (COPs). Ediciones Universidad de la Frontera. 2006;(1): p. 87-125.
18. Wania F. Assessing the potential of persistent organic chemicals for long-range transport and accumulation in polar regions. Environ. Sci. Technol. 2003;(37): p. 1344-1351.
19. Macdonal R, Barrie L, Bidleman T, Diamond., Gregor D, Semkin R, et al. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 year of progress in understanding sources, occurrence and pathways. Sci. Total. Environ. ;(254).
20. Bargagli R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. Sci. Total. Environ. 2008;(400): p. 212-226.
21. Gobierno de España. Introducción al conocimiento y prevención de los Contaminantes Orgánicos Persistentes Ministerio de Agricultura AyMA, editor. Madrid: Centro de Publicaciones Pº Infanta Isabel; 2012.
22. Eweis J, Ergas S, Chang D, Schoeder E. Principios de Remediación Hill MG, editor. Reino Unido; 1998.
23. Wania F, Donald. M. Tracking the distribution of Persistent Organic Pollutants. Environmental Science and Technology. 1996; 30(9).
24. Noyes P, McElwee M, Miller H, Clark B, Van Tiem., Walcott K, et al. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warmer world. Environ. 2009; 35: p. 971-986.
25. Spain J. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu Rev. Microbiol. 1995;(49): p. 523.
26. Diaz E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility: Int Microbiol; 2004.
27. Storck W, Layman P, Reisch M, Thayer A, Kirschner E, Peaff G, et al. Facts & figures for the chemical industry. Chem. Eng.: News; 1996.
28. NIST. Instituto Nacional de Estándares y Tecnología. U.S. Department de Commerce. [Online].; 2018 [cited 2019 Noviembre 12. Available from: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=98-95-3>.

29. European Chemicals Agency. European Chemical Agency. [Online].; 2019 [cited 2019 11 12]. Available from: https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.002.469?_disssubinfo_WAR_disssubinfoportlet_backURL=https%3A%2F%2Fecha.europa.eu%2Fes%2Finformation-on-chemicals%3Fp_p_id%3Ddisssimplesearchhomepage_WAR_dissearchportlet%26p_p_lifecycle.
30. Booth G. Gerald Booth (2007). "Nitro Compounds, Aromatic". In In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. New York: John Wiley & Sons; 2007.
31. Repetto M, P. S. Glosario de terminos usados en toxicología. Recomendaciones de la IUPAC1993. AET. 1995.
32. Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH): A review. Journal of Hazardous Materials. ; 2009.
33. Bracho M, Díaz L, Soto L. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por pseudomonas spp.: Ciencia; 2004.
34. Lika K, Papadakis I. Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae.: Journal of Sea Research; 2009.
35. Yen C, Chen K, Kao C, Liang S, Chen T. Application of persulfate to remediate petroleum hydrocarboncontaminated soil: Feasibility and comparison with common oxidants: Journal of Hazardous Materials; 2011.
36. Alexieva Z, Gerginva M, Zlateva P, Manasiev J, Ivanova D, Dimova N. Monitoring of aromatic pollutants biodegradation: Biochemical Engineering Journal; 2008.
37. Shan-Gen L. Mechanisms of granular activated carbon anaerobic fluidized-bed process for treating phenols wastewater: Journal of environment Science; 2002.
38. Villatoro-Monzón V, Mesta-Howard AM, Razo-Flores E. La Biodegradación anaerobia de compuestos aromáticos: Bio Tecnología; 2002.
39. Timmis K, Pieper D. Bacteria designed for bioremediation. 1999;(17): p. 200-204.
40. Wackett L, Bruce N. Environmental biotechnology: Towards sustainability. 2000;(11): p. 229-231.
41. Prieto M, Galán BTB, Ferrández A, Fernández C, Miñambres B, García J, et al. Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in Escherichia coli. FEMS. Microbiol. 2004;(28): p. 503-518.
42. Pieper D, Seeger M. Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2008;(15): p. 121-138.

43. Esteve-Nunez A, Lucchesi G, Philipp B, Schink B, Ramos J. Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. *Bacteriol.* 2000;(182): p. 1352-1355.
44. Gómez Á. Miguel Vicente: “Las bacterias son mucho más inteligentes que nosotros”: *Feedback Ciencia*; 2010.
45. Palleroni. Introduction to the family pseudomonadaceae. Springer-Verlag. 2006; p. 656-694.
46. Khan, A. R., Park, G. S., Asaf, S., Hong, S. J., Jung, B. K., & Shin, J. H. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PloS one.* 2017.
47. Jin, D. F., Hu, H., Liu, D. F., Ding, H. T., Jia, X. M., & Zhao, Y. H. Optimization of a bacterial consortium for nitrobenzene degradation. *Water Science and Technology.* 2012; p. 795-801.
48. Nishino, S. F., & Spain, J. C. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Applied and environmental microbiology.* 1993; p. 2520-2525.
49. Li, M., Cheng, X., & Guo, H. Heavy metal removal by biomineralization of urease producing bacteria isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2013; p. 81-85.
50. Zhao, D., Liu, C., Zhang, Y., & Liu, Q. Biodegradation of nitrobenzene by aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor (SBR). *Desalination.* 2011; p. 17-22.
51. Chain P, Denev V, Konstantinidis K, Vergez L, Agulló L, Reyes V, et al. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;(103): p. 15280-15287.
52. Jin DF, Hu H, Liu DF, Ding HT, Jia XM, Zhao YH. Optimization of a bacterial consortium for nitrobenzene degradation. *Water Sci Technol.* 2012; 65(5): p. 795-801.
53. Arora, Pankaj Kumar; Bae, Hanhong. *Journal of Chemistry.* 2014 Diciembre: p. 12.
54. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; 1989.
55. Purev, D., Bayarmaa, J., Ganchimeg, B., Ankhtsetseg, B., & Anumandal, O. Catalase, protease and urease activity in some types of soil. *Mongolian Journal of Chemistry.* 2012; p. 16-18.
56. Margesin, R., Walder, G., & Schinner, F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnologica.* 2000; p. 313-333.

57. Li, D., Yang, M., Li, Z., Qi, R., He, J., & Liu, H. Change of bacterial communities in sediments along Songhua River in Northeastern China after a nitrobenzene pollution event. *FEMS microbiology ecology*. 2008; p. 494-503.
58. Yu, Y. L., Shan, M., Fang, H. U. A., Wang, X., & Chu, X. Q. Responses of soil microorganisms and enzymes to repeated applications of chlorothalonil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; p. 10070-10075.
59. Dong, J., Ding, L., Chi, Z., Lei, J., & Su, Y. Kinetics of nitrobenzene degradation coupled to indigenous microorganism dissimilatory iron reduction stimulated by emulsified vegetable oil. *Journal of Environmental Sciences*. 2017; p. 206-216.
60. Wang, J., Yang, H., Lu, H., Zhou, J., & Zheng, C. Aerobic biodegradation of nitrobenzene by a defined microbial consortium immobilized in polyurethane foam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009; p. 875-881.
61. Liu, N., Wang, Y., An, Y., Ding, F., Yu, X., & Ye, K. Feasibility study of in-situ bioremediation for nitrobenzene-contaminated groundwater. *Water Science and Technology: Water Supply*. 2017; p. 1160-1167.

CAPITULO VII
ANEXOS

Anexo 1

Rangos múltiples ensayo de crecimiento

Bacteria	Medias	n	E.E.			
DICmgBF	1,24	3	0,01	A		
GL3	1,19	3	0,01	A		
DIC3MBF	0,31	3	0,01		B	
CL0	0,13	3	0,01			C
DIC0mg	0,13	3	0,01			C
DIC4M	0,07	3	0,01			C D
CP3	0,05	3	0,01			D
3//14	0,03	6	0,01			D
3//8	0,02	3	0,01			D
Cha2	0,02	1	0,02			D
DIC1emp	0,02	3	0,01			D
Cha1	0,02	1	0,02			D
R4	0,01	3	0,01			D
GL1	0,01	3	0,01			D
Cha0	0,01	1	0,02			D

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,96	14	0,5	1222	<0,0001
bacteria	6,96	12	0,58	1425,22	<0,0001
repeticion	2,20E-03	2	1,10E-03	2,66	0,0884
Error	0,01	27	4,10E-04		
Total	6,97	41			

Anexo 2

Análisis estadístico objetivo 2

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
96 HORAS	15	0,94	0,9	3,37

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,19	6	0,03	21,79	0,0002
REP	0,01	2	3,20E-03	2,16	0,1779
CEPA	0,18	4	0,05	31,61	0,0001
Error	0,01	8	1,50E-03		
Total	0,2	14			

Anexo 3

Rangos múltiples objetivo 2

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,09351

Error: 0,0011 gl: 8

CEPA	Medias	n	E.E.	
GL3	1,18	3	0,02	A
DIC3MBF	1,18	3	0,02	A
DIC0MG	1,14	3	0,02	A
CLOMG	1,14	3	0,02	A
DICMGBF	0,93	3	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)