

29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO DE LA TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE
BIFENILOS POLICLORADOS DE ACEITES
DIELÉCTRICOS INDUSTRIALES Y SU DEGRADACIÓN
AEROBIA Y ANAEROBIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN INGENIERIA AMBIENTAL

P R E S E N T A

DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO

DIRECTORA

DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ



MÉXICO, D.F.

JULIO DE 1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

272976



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y personas que han hecho posible la realización de la presente investigación:

A la Universidad Regiomontana especialmente al Dr. Enrique Cárdenas G. por la dirección, revisión y el apoyo brindado para la realización de la presente tesis.

Al Instituto de Química de la U.N.A.M., en especial al Dr. Federico García Jiménez por su excelente colaboración, revisión y el tiempo dedicado en la realización de los estudios analíticos.

Al Departamento de Ciencias y Técnicas del Agua y Medio Ambiente de la Universidad de Cantabria (España), en especial a los doctores Juan José Amieva del Wal e Iñaki Tejero Monzón por las facilidades brindadas para la realización del trabajo experimental.

A la Sección de Ingeniería Ambiental de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería de la U.N.A.M., en especial a los doctores Georgina Fernández V., Pedro Martínez Pereda y demás miembros del jurado por la revisión y sugerencias al presente escrito.

RESUMEN.-

Se presenta un estudio de biodegradación de bifenilos policlorados (BPCs) utilizando un pretratamiento químico de nitración de la molécula de BPC y posterior reducción a amina en posiciones *orto* y *para* con el objeto de "incitar" al microorganismo a utilizar el BPC aminado como fuente de carbono y nitrógeno y considerando las interacciones entre el cambio de sus nuevas características fisicoquímicas y el incremento de su capacidad para ser biodegradado. Se aplica un método de tratamiento anaerobio y otro aerobio con reactores de biomembrana como tecnología de punta. El proceso más importante en estos reactores, es la separación entre las altas concentraciones de BPC y los microorganismos, pero permitiendo su paso a través de las membranas hidrófobas de manera dosificada.

Los resultados obtenidos de la investigación, confirman la eficiencia de los reactores de biomembrana como una de las tecnologías más apropiadas para la biodegradación en combinación con el pretratamiento de aminación de la molécula de BPC, lo que supone una nueva ruta de actividad metabólica para la degradación de los BPCs.

El rendimiento global del proceso de biodegradación en el reactor aerobio es del 85 %, siendo el 59.9 % para los pentaclorobifenilos, 56.78% para los hexaclorobifenilos y 56.85% para los heptaclorobifenilos presentes en la muestra. En proceso de biodegradación anaerobio el rendimiento global es del 80%, siendo el 63 % para los pentaclorobifenilos, 49.87% para los hexaclorobifenilos y 49.97% para los heptaclorobifenilos.

En la revisión bibliográfica, se hace mención sobre los principales estudios realizados por los diversos autores sobre temas referentes a las características fisicoquímicas, identificación y efectos de los BPCs en salud y ambiente, así como la legislación existente sobre los mismos.

Se presenta además, una revisión documentada de los distintos procesos de tratamiento que hasta el momento se han aplicado a los BPCs. La conclusión más importante que se extrae de esta revisión, es la factibilidad de los procesos biológicos de tratamiento como las tecnologías más atractivas económicamente, en comparación con los tratamientos fisicoquímicos. Debido a la reducción de costos de operación y de inversión los reactores de biomembranas hidrófobas representan una de las tecnologías más atractivas por sus excelentes rendimientos en el tratamiento de eliminación de BPCs y compuestos cloroaromáticos.

SUMMARY

This work presents the biodegradation study of the polychlorinated biphenyl's (PCBs) using a nitration chemical pre-treatment of the PCB molecule and further reduction reaction to amine in *ortho* and *para* positions. The aim of this, is "to incite" the microorganisms to use the aminated PCBs as sole carbon and nitrogen source and considering the interaction between their new physicochemical characteristics and the increments of their biodegradation capacity. In order to achieve the previous, anaerobic and aerobic methods with biomembranes reactors have been used. The more important process in these reactors is the separation between high PCB concentrations and the microorganisms but permitting their diffusion through hydrophobic membranes in a dosificated manner.

The results of the investigation, confirmed the high biomembranes reactor efficiency as a most appropriated technology for the biodegradation combined with the amination pretreatment of the PCB molecule. These supposed a novel route of metabolic activity for the degradation of PCBs.

The aerobic and anaerobic processes' efficiencies were 85% and 80%; and these efficiencies for the biodegradation of the pentachlorobiphenyls isomers were 59,9% and 63% respectably; for the hexachlorobiphenyls isomers in the PCBs samples were 56.78 and 49.87% and for the biodegradation of the heptachlorobiphenyls isomers were 58.85% and 49.97% respectably.

Different scientific papers about the PCBs physicochemical characteristics, identification and their health and environmental effects have been taken into consideration. Also the corresponding legislation has been revised.

Moreover, this paper includes a thorough revision of all the different PCBs treatment process. The most important conclusion of this revision, is the factibility of the biological treatment process as the more economic technology in comparison with the physicochemical treatments. Due to reduced operation and inversion cost.

RELACIÓN DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura III-1.- Estructura molecular de los BPCs.	III-1
Figura III-2.- (A) Arilación del peróxido 33',44'-tetraclorobenzoilo a 3,4-diclorobifenilo.(B) Arilación de 3,4-dicloroanilina a 2,3',4',5-tetraclorobifenilo.	III-2
Figura III-3.- (A) Condensación del 2,4,6-tricloro-iodobenceno a 22', 44', 66'-hexaclorobifenilo.	III-3
Figura III-4.- (B) Condensación de tricloro-iodobenceno a hexaclorobifenilo.	III-4
Figura III-5.- Obtención de BPCs por reacciones fotoquímicas.	III-4
Figura III-6.- Estructura de los BPCs coplanares mono- y di- <i>orto</i> sustituidos.	III-5
Figura III-7.- Coeficientes utilizados para calcular los efectos (CES) de varios tipos de sustitución.	III-7
Figura IV-1.- Espectro de masas con ionización química (CI/MS) de varios isómeros de BPCs.	IV-13
Figura IV-2.- Iones característicos del programa de monitoreo de masas de los Aroclors® 1912 y 1221.	IV-16
Figura IV-3.- Iones característicos del programa de monitoreo de masas de los Aroclors® 1232 y 1242.	IV-17
Figura IV-4.- Iones característicos del programa de monitoreo de masas de los Aroclors® 1254 y 1260.	IV-18
Figura IX-1.- Mecanismo de nitración del bifenilo.	IX-2
Figura IX-2.- Estructuras resonantes del grupo nitro	IX-4
Figura IX-3.- Ataque del ion nitronio al bifenilo	IX-4
Figura IX-4.- Mecanismo de nitración del bifenilo	IX-5
Figura IX-5.- Estructura del ion bencenio	IX-6
Figura IX-6.- Estructuras resonantes del bifenilo	IX-6
Figura IX-7.- Sustitución electrófila del bifenilo	IX-8
Figura IX-8.- Estructura compuesta de resonancia	IX-9
Figura IX-9.- Orientación de la sustitución del bifenilo	IX-11
Figura IX-10.- Velocidades de la nitración	IX-12
Figura IX-11.- 6,6'-dinitro 2,2'-diclorobifenilo	IX-12
Figura IX-12.- 3,3',4,4'-tetraclorobifenilo y 2-nitro-3'-4,4'-5 tetracloro bifenilo.	IX-12
Figura IX-13.- 4-nitro 4'-clorobifenilo y 6-nitro -4,2',3',4',5' Pentaclorobifenilo	IX-13
Figura IX-14.- Estructuras de resonancia de las arilaminas	IX-14
Figura IX-15.- Estructuras de resonancia del arilamonio	IX-14
Figura X-1.- Reacciones secuenciales propuestas para el crecimiento anaerobio a partir del ácido benzóico	X-3
Figura X-2.- Fisión de los anillos bencénicos catalizados por dioxigenasas	X-4
Figura X-3.- Tipos de reacciones involucradas en la ruptura de los enlaces carbono-carbono de los sustratos encontrados en el catabolismo de compuestos aromáticos.	X-6
Figura X-4.- Rutas de transformación <i>meta</i> del compuesto catecol	X-9
Figura X-5.- Ruta de ruptura <i>orto</i> de transformación de los compuestos hidroxiquinol.	X-11
Figura X-6.- Degradación bacteriana del 3,5-diclorocatecol	X-14

Figura X-7.- Biodegradación del 4-clorobifenilo por una bacteria Gram negativa en presencia de nitrato.	X-15
Figura X-8.- Ruta metabólica principal de los BPCs realizada por bacterias	X-19
Figura XI-1.- Mecanismos de biodegradación aerobia de bifenilos policlorados	XI-9
Figura XII-1.- Comparación gráfica de los modelos de Monod y Blackman	XII-10
Figura XII-2.- Perfiles de sustrato y oxígeno en un biopelícula de soporte permeable.	XII-14
Figura XIII-1.- Recta de calibrado del patrón tetraclorobifenilo	XIII-5
Figura XIII-2.- Recta de calibrado del patrón pentaclorobifenilo	XIII-6
Figura XIII-3.- Recta de calibrado del patrón hexaclorobifenilo	XIII-6
Figura XIII-4.- Recta de calibrado del patrón heptaclorobifenilo	XIII-6
Figura XIII-5.- Representación esquemática de las condiciones en que se realizan los bioensayos	XIII-13
Figura XIII-6.- Elemento estructural de soporte del reactor aerobio	XIII-23
Figura XIII-7.- Vaso o recipiente del biorreactor	XIII-24
Figura XIII-8.- Perspectiva de los elementos del reactor de biomembrana	XIII-25
Figura XIII-9.- Detalles de los cortes del reactor aerobio	XIII-28
Figura XIII-10.- Sistema de operación del reactor de biomembranas aerobio	XIII-31
Figura XIII-11.- Detalle de los cortes A y B del reactor anaerobio	XIII-32
Figura XIV-1.- Análisis cromatográfico del Aroclor [®] 1248 nitrado	XIV-4
Figura XIV-2.- Espectro de masas del Aroclor [®] 1248 nitrado (tetraclorados mononitrados)	XIV-5
Figura XIV-3.- Espectro de masas del Aroclor [®] 1248 nitrado (mono y diclorado dinitrado)	XIV-6
Figura XIV-4.- Espectro de masas del Aroclor [®] 1248 nitrado (tetra y pentaclorado dinitrado)	XIV-7
Figura XIV-5.- Espectro de masas del Aroclor [®] 1248 nitrado (tricloro dinitrado)	XIV-7
Figura XIV-6.- RMN por ¹ H del Aroclor [®] 1248 nitrado	XIV-9
Figura XIV-7.- RMN por ¹³ C del Aroclor [®] 1248 nitrado	XIV-10
Figura XIV-8.- Análisis cromatográfico del Aroclor [®] 1254 nitrado	XIV-11
Figura XIV-9.- Espectro de masas del Aroclor [®] 1254 nitrado	XIV-11
Figura XIV-10.- Espectro de masas del Aroclor [®] 1254 nitrado	XIV-12
Figura XIV-11.- Análisis de resonancia magnética nuclear por ¹ H del Aroclor [®] 1254 nitrado	XIV-13
Figura XIV-12.- Análisis de resonancia magnética nuclear por ¹³ C del Aroclor [®] 1254 nitrado	XIV-14
Figura XIV-13.- Análisis cromatográfico de los BPCs puros	XIV-15
Figura XIV-14.- Análisis cromatográfico de los BPCs nitrados	XIV-18
Figura XIV-15.- Análisis cromatográfico de los BPCs aminados	XIV-15
Figura XIV-16.- Espectros de masas de los bifenilos mono, di, tri y tetraclorados diaminados	XIV-20
Figura XIV-17.- Espectros de masas de los bifenilos tri, tetra y pentaclorados diaminados	XIV-20
Figura XIV-18.- Espectros de masas de los bifenilos penta, hexa, y heptaclorados mononitrados	XIV-21
Figura XIV-19.- Análisis de RMN por ¹ H para la muestra de BPC puro	XIV-23
Figura XIV-20.- Análisis de RMN por ¹³ C para la muestra de BPC puro	XIV-24
Figura XIV-21.- Análisis de RMN por ¹ H para la muestra de BPCs nitrados	XIV-26
Figura XIV-22.- Análisis de RMN por ¹³ C para la muestra de BPC nitrados	XIV-27

Figura XIV-23.- Rendimiento del tratamiento de nitración y aminación de los BPCs	XIV-28
Figura XIV-24.- Detalles de la cuantificación de los BPCs puros, nitrados y aminados	XIV-29
Figura XIV-25.- Cambio de la coloración del BPC puro, nitrado y aminado	XIV-31
Figura XIV-26.- Análisis calorimétrico diferencial de la muestra de BPC puro, atmósfera inerte de N ₂ y velocidad de calentamiento 10°C/min	XIV-32
Figura XIV-27.- Análisis calorimétrico diferencial de la muestra de BPC nitrado, atmósfera inerte de N ₂ y velocidad de calentamiento de 10°C/min	XIV-32
Figura XIV-28.- Amarilleamiento del medio como prueba de la biodegradación del BPC aminado	XIV-34
Figura XIV-29.- Cromatograma de los metabolitos generados al 1° día en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias	XIV-35
Figura XIV-30.- Metabolitos generados del bioensayo utilizando una mezcla de bacterias al 1° día	XIV-36
Figura XIV-31.- Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias	XIV-37
Figura XIV-32.- Metabolitos generados del bioensayo utilizando una mezcla de bacterias al 3° día	XIV-38
Figura XIV-33.- Cromatograma de los metabolitos generados al 7° día en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias	XIV-38
Figura XIV-34.- Metabolitos generados del bioensayo utilizando una mezcla de bacterias al 7° día	XIV-40
Figura XIV-35.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias al 1°, 3° y 7° día	XIV-40
Figura XIV-36.- Cromatograma de los metabolitos generados al 1° día en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .	XIV-41
Figura XIV-37.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> al 1° día	XIV-42
Figura XIV-38.- Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	XIV-43
Figura XIV-39.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> al 3° día	XIV-44
Figura XIV-40.- Cromatograma de los metabolitos generados al 7° día en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	XIV-45
Figura XIV-41.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> al 7° día	XIV-46
Figura XIV-42.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> al 1°, 3° y 7° día	XIV-46
Figura XIV-43.- Cromatograma de los metabolitos generados al 1° día en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos	XIV-47
Figura XIV-44.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos al 1° día	XIV-48
Figura XIV-45.- Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos	XIV-49
Figura XIV-46.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos al 3° día	XIV-50
Figura XIV-47.- Cromatograma de los metabolitos generados al 7° día en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos	XIV-50
Figura XIV-48.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla	XIV-52

de hongos al 7° día	
Figura XIV-49.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos al 1°, 3° y 7° día	XIV-52
Figura XIV-50.- Cromatograma de los metabolitos generados al 1° día utilizando una mezcla de todos los microorganismos	XIV-53
Figura XIV-51.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos	XIV-54
Figura XIV-52.- Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos	XIV-54
Figura XIV-53.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos	XIV-55
Figura XIV-54.- Cromatograma de los metabolitos generados al 7° día en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos	XIV-56
Figura XIV-55.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos al 7° día	XIV-57
Figura XIV-56.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos al 1°, 3° y 7° día	XIV-58
Figura XIV-57.- Detalles del reactor aerobio	XIV-60
Figura XIV-58.- Equipos de monitoreo de pH, temperatura y O ₂ disuelto del reactor aerobio	XIV-61
Figura XIV-59.- Detalles del reactor anaerobio	XIV-62
Figura XIV-60.- Detalles del reactor anaerobio con soporte extraíble	XIV-62
Figura XIV-61.- Detalles de la biopelícula en el reactor anaerobio	XIV-63
Figuras XIV-62 a la XIV-87.- Cromatogramas y metabolitos generados en el reactor aerobio	XIV-66 a XIV-91
Figura XIV-88.- Rendimiento de la biodegradación aerobia	XIV-91
Figuras XIV-89 a la XVI-110 Cromatograma y metabolitos generados en el reactor anaerobio	XIV-96 a XIV-117
Figura XIV-111.- Cuantificación de los metabolitos generados en el reactor anaerobio durante el período de tratamiento	XIV-117
Figura XIV-112.- Determinación de pH en los reactores aerobio y anaerobio	XIV-121
Figura XIV-113.- Determinación de DQO en los reactores	XIV-123
Figura XIV-114.- Incremento de DQO por adición de surfactantes en el reactor aerobio	XIV-123
Figura XIV-115.- Relación DBO, DQO y Cloruros generados en el reactor aerobio	XIV-123
Figura XIV-116.- Determinación de cloruros generados en los reactores	XIV-124
Figura XIV-117.- Relación de DQO y Cloruros generados en el reactor anaerobio	XIV-125
Figura XIV-118.- Relación de carbono orgánico e inorgánico en el reactor anaerobio	XIV-126
Figura XIV-119.- Relación de carbono orgánico e inorgánico en el reactor aerobio.	XIV-126

RELACIÓN DE TABLAS

	<i>Página</i>
Tabla III-1.- Nomenclatura, número de isómeros, peso molecular y contenido de cloro en BPCs.	III-1
Tabla III-2.- Bifenilos policlorados planares, nono y di-orto.	III-5
Tabla III-3.- Numeración sistemática de los isómeros de BPCs.	III-7
Tabla III-4.- Características de las mezclas de Aroclor.	III-10
Tabla III-5.- Valores de solubilidad en agua para BPCs.	III-11
Tabla III-6.- Valores de K_{ow} para algunos congéneres de BPCs.	III-11
Tabla III-7.- Valores del factor de bioconcentración	III-11
Tabla III-8.- Rangos de las principales propiedades ambientales del BPCs.	III-12
Tabla III-9.- Propiedades ambientales por mezcla de Aroclor.	III-12
Tabla III-10.- Contenido de cloro y número de registro de Chemical Abstract (CAS) de los diferentes tipos de Aroclor.	III-13
Tabla III-11.- Comparación de varias series de mezclas comerciales de BPCs.	III-13
Tabla III-12.- Composición promedio y porcentaje en peso de cloro en diferentes tipos de Aroclor.	III-14
Tabla III-13.- Porcentajes aproximados en peso de cloro (peso/vol) y diferentes grados de cloración de varios Aroclors®.	III-14
Tabla III-14.- Nombres de los productos comerciales	III-15
Tabla III-15.- Producción (T_m) de BPCs en los países miembros de la OCDE.	III-16
Tabla III-16.- Principales aplicaciones de los Aroclors.	III-17
Tabla III-17.- Ventas en Norteamérica de BPCs por tipo de Aroclor y categorías de uso.	III-17
Tabla III-18.- Registros de aplicación de BPCs en los países miembros de la OECD.	III-18
Tabla IV-1.- Programa de detección de masas	IV-9
Tabla IV-2.- Tiempos de retención de Aroclors en sistemas con columnas capilares DB-5/DB-7101.	IV-15
Tabla IV-3.- Procedimientos estándares de análisis para BPCs.	IV-22
Tabla V-1.- Valores de factores de equivalencia de toxicidad (FET) para congéneres coplanares nono-orto y di-orto sustituidos.	V-4
Tabla V-2.- Concentración de BPCs en animales.	V-5
Tabla V-3.- Efectos y manifestaciones comunes de la exposición a los BPCs en animales.	V-7
Tabla V-4.- Niveles de contaminación por BPCs en aire, agua, suelo y sedimentos.	V-12
Tabla X-1.- Productos metabólicos de los congéneres de BPCs biodegradados por <i>Acinetobacter sp.</i>	X-16
Tabla XI-1.- Efecto de los patrones de sustitución de cloro en la biodegradabilidad de varios congéneres de BPCs.	XI-10
Tabla XI-2.- Metabolismo de BPC por <i>Alcaligenes sp.</i> y <i>Acinetobacter sp.</i>	XI-12
Tabla XI-3.- Factores que tienen gran influencia en la biodegradación de los bifenilos policlorados.	XI-33

Tabla XIII-1.- Medio mineral utilizado en los reactores	XIII-19
Tabla XIV-1.- Rendimiento de la nitración de los estándares	XIV-1
Tabla XIV-2.- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1232	XIV-2
Tabla XIV-3.- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1242	XIV-2
Tabla XIV-4.- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1248	XIV-3
Tabla XIV-5.- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1254	XIV-3
Tabla XIV-6.- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1260	XIV-4
Tabla XIV-7.- tiempos de retención de los congéneres del Aroclor® 1248 nitrado	XIV-8
Tabla XIV-8.- Peso promedio del BPC puro, nitrado y aminado	XIV-14
Tabla XIV-9.- Tiempos de retención y rectas de calibrado de los congéneres de BPC puro	XIV-9
Tabla XIV-10.- Análisis cualitativo de bifenilos policlorados puros	XIV-10
Tabla XIV-11.- Congéneres nitrados	XIV-18
Tabla XIV-12.- Congéneres que no se nitraron y producto de dechloración	XIV-18
Tabla XIV-13.- Valores de masas de los BPCs aminados determinadas por espectrometría de masas	XIV-21
Tabla XIV-14.- Análisis cualitativo de los bifenilos policlorados aminados	XIV-21
Tabla XIV-15.- Congéneres que no se aminaron	XIV-22
Tabla XIV-16.- Congéneres formados como productos de dechloración	XIV-22
Tabla XIV-17.- Cambios por temperatura de la muestra de BPCs nitrados	XIV-30
Tabla XIV-18.- Cambios experimentados por las muestras analizadas	XIV-31
Tabla XIV-19.- Valores obtenidos de los análisis de ecotoxicidad	XIV-33
Tabla XIV-20.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias al 1° día	XIV-35
Tabla XIV-21.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de baterias al 3° día	XIV-37
Tabla XIV-22.- Tiempos de retención y metabolitos generados en los bioensayos utilizando una mezcla de bacterias al 7° día	XIV-39
Tabla XIV-23.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> al 1° día	XIV-41
Tabla XIV-24.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> al 3° día.	XIV-43
Tabla XIV-25.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> al 7° día	XIV-45
Tabla XIV-26.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos al 1° día	XIV-47
Tabla XIV-27.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos al 3° día	XIV-49
Tabla XIV-28.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos al 7° día	XIV-51

Tabla XIV-29.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando la mezcla de todos los microorganismos al 1° día	XIV-53
Tabla XIV-30.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando la mezcla de todos los microorganismos al 3° día	XIV-55
Tabla XIV-31.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando la mezcla de microorganismos al 7° día	XIV-56
Tabla XIV-32.- Metabolitos organoclorados generados en los bioensayos	XIV-59
Tabla XIV-33.- Parámetros determinados en los bioensayos con extracción de metabolitos	XIV-60
Tabla XIV-34.- Congéneres de clorobifenilos (que no han sido aminados) introducidos a los reactores junto con los congéneres aminados	XIV-64
Tablas XIV-35 a la XIV-46.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 7°, 11°, 15°, 21°, 27°, 32°, 37° y 45° día	XIV-66 a XIV-90
Tabla XIV-47.- Metabolitos organoclorados generados en el reactor aerobio durante todo el período de tratamiento	XIV-92
Tabla XIV-48.- Congéneres de BPCs que permanecen en el medio y productos de dechloración generados en el reactor aerobio	XIV-93
Tablas XIV-49 a la XIV-59.- Metabolitos organoclorados generados en el reactor anaerobio al 1°, 2°, 4°, 5°, 7°, 11°, 15°, 21°, 27°, 34 y 37° día	XIV-96 a XIV-116
Tabla XIV-60.- Metabolitos organoclorados generados en el reactor anaerobio durante todo el período de tratamiento.	XIV-118
Tabla XIV-61.- Congéneres de BPCs que permanecen en el medio y productos de dechloración generados en el reactor anaerobio.	XIV-119
Tabla XIV-62.- Valores obtenidos de los análisis de ecotoxicidad de los metabolitos en los reactores	XIV-120
Tabla XIV-63.- Determinación de parámetros del reactor aerobio (1) utilizando BPC aminado como única fuente de carbono y nitrógeno	XIV-127
Tabla XIV-64.- Determinación de parámetros del reactor anaerobio (2) utilizando BPC aminado como única fuente de carbono y nitrógeno	XIV-128

ÍNDICE

RESUMEN	<i>i</i>
SUMMARY	<i>ii</i>
RELACIÓN DE FIGURAS	<i>iii</i>
RELACIÓN DE TABLAS	<i>iv</i>

	<i>páginas</i>
1.- INTRODUCCIÓN	I-1
2.- OBJETIVOS	II-1
2.1. Objetivo general	II-1
2.1.1. Objetivos específicos	II-1
2.1.2. Hipótesis	II-1
2.1.3. Justificación	II-1
2.1.4. Alcance	II-2
3.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS	III-1
3.1. Estructura	III-1
3.2. Síntesis	III-2
3.3. Nomenclatura	III-4
3.4. Estereoquímica	III-5
3.5. Propiedades	III-8
3.6. Mezclas comerciales	III-12
3.7. Producción	III-14
3.8. Aplicaciones	III-16
4.- MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BPCs	IV-1
4.1. Procedimiento analítico	IV-1
4.1.1. Muestreo	IV-1
4.1.2. Extracción	IV-2
4.1.2.1. Muestreo de matrices gaseosas	IV-3
4.1.2.2. Muestreo en agua	IV-3
4.1.2.3. Muestreo de suelos y sedimentos	IV-3
4.1.2.4. Muestreo de tejidos animales	IV-4
4.2. Purificación	IV-4
4.3. Separación e identificación	IV-6
4.3.1. Inyección	IV-7
4.3.2. Separación	IV-7
4.3.3. Detección	IV-8
4.4. Cuantificación	IV-11
4.5. Otros métodos de determinación de BPCs	IV-18
4.5.1. Radio inmuno ensayo	IV-18
4.5.2. Bioensayos mediante células de hepatoma de ratas H-4-11E	IV-18
4.5.3. Ensayo competitivo de unión para ligandos del receptor Ah	IV-19
4.5.4. Propiedades del espectro de UV de los BPCs	IV-19

4.5.5 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	IV-19
4.6. Mediciones en campo	IV-20
4.6.1 Espectrómetro Miran 980	IV-20
4.6.2. Detector de fluorescencia de rayos X	IV-20
4.6.3. Estuche químico de prueba en Campo	IV-20
4.6.4. Analizador de contaminación para derrames de BPCs	IV-20
4.6.5. Kits de pruebas	IV-21
5. EFECTOS EN SALUD Y MEDIO AMBIENTE	V-1
5.1. Fuentes de contaminación por BPCs	V-1
5.2. Principales casos de contaminación por BPCs	V-1
5.3. Rutas de exposición y efectos en humanos	V-2
5.4. Efectos en animales	V-2
5.5. Principales efectos	V-5
5.5.1. Carcinogenicidad	V-5
5.5.2. Mutagenicidad	V-6
5.5.3. Teratogenicidad	V-6
5.5.4. Efectos en plantas	V-6
5.6 Contaminación del ambiente	V-7
5.6.1. Transporte y acumulación ambiental	V-8
5.6.1.1. Aire	V-8
5.6.1.2. Agua	V-9
5.6.1.3. Suelos y sedimentos	V-10
5.6.1.4. Bioacumulación	V-10
5.6.1.5. Contaminación de alimentos	V-11
5.7. Modelos de distribución	V-11
6. LEGISLACIÓN	VI-1
6.1. Reglamentación de la U.S.EPA.	VI-1
6.2. Permisos para el tratamiento de BPCs	VI-3
6.3. Legislación de la Comunidad Europea	VI-5
6.3.2. Legislación Española	VI-7
6.4. Legislación Mexicana	VI-9
6.4.1. Marco regulatorio	VI-10
6.4.2. Transporte de BPCs	VI-12
6.4.3. Transvasado de BPCs	VI-12
6.4.4. Embarque de BPCs	VI-13
7. TRATAMIENTOS FISICOQUIMICOS	VII-1
7.1. Métodos químicos	VII-2
7.1.1. Decloración con naftenatos de sodio	VII-2
7.1.2. Reacciones organometálicas	VII-3
7.1.3. Empleo de polietilenglicolatos de sodio	VII-4
7.1.4. Otros métodos de destoxificación química	VII-5
7.1.5. Rellenado de transformadores	VII-7
7.1.6. Sustitución de fluidos dieléctricos	VII-7
7.1.7. Descomposición nucleofílica	VII-8
7.1.8. Clorólisis	VII-8

7.1.9. Ozonólisis	VII-8
7.1.10. Reducción electroquímica	VII-9
7.2. Métodos físicos	VII-9
7.2.1. Incineración	VII-9
7.2.2. Incineración de Condensadores BPC	VIII-10
7.2.3. Hornos de Incineración	VII-10
7.3. Métodos de tratamiento alternos	VII-12
7.3.1. Tecnología de arco de plasma	VII-12
7.3.2. Extracción	VII-12
7.3.3. Extracción supercrítica	VII-12
7.3.4. Destilación	VII-13
7.3.5. Ósmosis inversa	VII-13
7.3.6. Adsorción	VII-13
7.3.7. Matrices de aislamiento	VII-13
7.3.8. Proceso de gasificación	VII-14
7.3.9. Tecnologías de oxidación avanzada.	VII-15
7.3.10. Fotólisis	VII-15
7.3.11. Método UV/H ₂	VII-15
7.3.12. Método UV/O ₃ o UV/H ₂ O ₂	VII-15
7.3.13. Oxidación con aire húmedo	VII-16
7.3.14. Radiación Gamma	VII-16
7.3.15. Irradiación de electrones	VII-16
7.3.16. Partículas Beta	VII-16
7.4. Confinamientos en sitios controlados	VII-17
8.- UTILIZACIÓN DE SURFACTANTES	VIII-1
8.1. Estructura química de los agentes tensoactivos	VIII-1
8.2. Aplicación de agentes tensoactivos	VIII-1
8.3. Biorrestauración de suelos contaminados	VIII-2
9. NITRACIÓN DE BPCs	IX-1
9.1. Generalidades de las sustituciones aromáticas	IX-1
9.2. Propiedades del grupo NO ₂	IX-3
9.3. Características de la nitración de bifenilos	IX-5
9.3.1. Sustituciones electrofílicas múltiples de los anillos del bifenilo	IX-7
9.4. Reactividad de anillo aromático	IX-7
9.4.1. Orientación de la sustitución electrófila del grupo nitro	IX-9
9.5. Reducción de nitroclorobifenilos	IX-13
9.5.1. Aminación del anillo aromático	IX-13
9.6. Generalidades de las aminas	IX-14
9.7. Métodos de identificación de aminas aromáticas	IX-15
9.7.1. Identificación por espectroscopía de masas	IX-15
9.7.2. Identificación por espectroscopía infrarroja	IX-15
9.7.3. Identificación por espectroscopía de resonancia magnética nuclear	IX-16
10. BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	X-1
10.1. Fisión anaerobia del anillo bencénico	X-2
10.2. Ruptura aerobia del anillo bencénico	X-3

10.2.1. Mecanismos de reacción para la ruptura del anillo	X-5
10.2.1.1. Rutas de ruptura del anillo	X-7
10.2.1.2. Rutas de ruptura en <i>meta</i>	X-7
10.2.1.3. Rutas de ruptura en <i>orto</i>	X-10
10.3. Transformación de bifenilos	X-12
10.4. Transformación de bifenilos policlorados	X-12
10.4.1. Enzimas involucradas en la degradación de BPCs	X-14
10.4.2. Rutas de transformación biológica	X-15
10.4.2.1. Productos metabólicos	X-16
10.4.2.2. Enzimas involucradas en la degradación de benzoatos	X-18
10.4.2.3. Metabolismo de BPCs en mamíferos	X-18
10.5. Biodegradación de compuestos nitroaromáticos	X-19
10.5.1. Reducción del grupo nitro	X-20
10.5.2. Eliminación del grupo nitro	X-21
11. MÉTODOS DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO	XI-1
11.1. Pruebas de biodegradabilidad de BPCs	XI-2
11.2. Microorganismos capaces de degradar BPCs	XI-4
11.2.1. Bacterias	XI-4
11.2.2. Hongos	XI-6
11.3. Biodegradación aerobia de BPCs	XI-7
11.3.1. Factores de la degradación aerobia	XI-9
11.3.2. Patrones de degradación	XI-10
11.3.3. Biodegradación de productos comerciales de BPCs	XI-11
11.3.4. Transformación total de BPCs con plásmidos	XI-13
11.4. Degradación de compuestos relacionados con BPCs	XI-16
11.4.1. Bifenilos	XI-17
11.4.2. Benceno	XI-17
11.4.3. Benzoato	XI-17
11.4.4. Ácido clorobenzóico	XI-17
11.4.5. Clorobenzenos	XI-18
11.4.6. Cloronitrobenzenos	XI-19
11.4.7. Anilinas	XI-19
11.4.8. Cloroanilinas	XI-19
11.5. Tratamientos anaerobios	XI-20
11.5.1. Rutas de dechloración	XI-22
11.5.1.1. Procesos de dechloración individuales	XI-25
11.5.1.2. Proceso M	XI-25
11.5.1.3. Proceso Q	XI-26
11.5.1.4. Proceso H'	XI-26
11.5.1.5. Proceso H	XI-26
11.5.1.6. Proceso P	XI-27
11.5.1.7. Proceso N	XI-27
11.5.1.8. Procesos combinados de dechloración	XI-27
11.6. Factores que afectan la tasa y extensión de dechloración de BPCs	XI-28
11.7. Microorganismos responsables de la dechloración	XI-29

11.8. Consideraciones electrostáticas	XI-30
11.9. Factores que limitan la biodegradación de BPCs en suelos	XI-31
12. REACTORES UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE BPCs	XII-1
12.1. Reactores UASB	XII-1
12.2. Reactores de biomembrana	XII-2
12.2.1. Variables y condiciones que afectan los procesos del biorreactor	XII-2
12.3. Biopelículas	XII-4
12.3.1. Espesor de la biopelícula	XII-6
12.3.2. Concentración de sólidos de la biopelícula	XII-7
12.3.3. Biología de las biopelículas	XII-8
12.3.4. Transporte y reacciones en la biopelícula	XII-8
12.3.5. Asimilación del sustrato	XII-9
12.4. Modelos de transferencia de masa	XII-9
12.4.1. Análisis de la transferencia de oxígeno en la biopelícula	XII-11
12.4.2. Factores de la transferencia de oxígeno	XII-13
12.4.2.1. Agentes tensoactivos	XII-13
12.4.2.2. Eliminación de sales minerales	XII-13
12.4.2.3. Características físicas de las células	XII-13
12.4.2.4. Respiración de células en la interfase gas-líquido	XII-13
12.5. Membranas como medio de soporte de la biopelícula	XII-15
12.5.1. Propiedades de la membrana	XII-15
12.5.2. Membranas de silicona	XII-16
12.6. Modelación matemática de la biopelícula	XII-17
12.7. Fenómenos importantes en la biopelícula	XII-20
12.7.1. Área interfacial	XII-20
12.7.2. Hidrofobicidad	XII-21
12.7.3. Presión de burbuja y presión de mojado	XII-21
12.7.4. Hidrodinámica	XII-22
12.7.5. Fricción	XII-23
13. METODOLOGÍA	XIII-1
13.1. Etapas del trabajo experimental	XIII-2
13.2. Obtención de muestras de aceites dieléctricos	XIII-3
13.3. Determinación de la concentración de BPCs en las muestras de aceite	XIII-3
13.3.1. Técnica de extracción de BPCs	XIII-3
13.3.2. Técnica de purificación	XIII-3
13.4. Determinación cromatográfica de BPCs	XIII-4
13.4.1. Condiciones operativas del cromatógrafo de gases	XIII-4
13.4.2. Soluciones patrón	XIII-5
13.4.3. Requerimientos instrumentales	XIII-7
13.4.4. Reactivos utilizados	XIII-7
13.5. Pretratamiento químico	XIII-7
13.5.1. Procedimiento de nitración	XIII-7
13.5.2. Técnica de reducción con hidrazina	XIII-8
13.5.3. Reactivos	XIII-8
13.5.4. Materiales y equipo	XIII-9

13.6. Manejo de residuos	XIII-9
13.7. Predicción de posiciones nitradas	XIII-9
13.7.1. Tratamiento matemático en programa MatLab	XIII-9
13.8. Caracterización analítica de BPCs nitrados y aminados	XIII-10
13.9. Determinación por resonancia magnética nuclear	XIII-10
13.10. Caracterización fisicoquímica de los BPCs nitrados	XIII-11
13.10.1. Análisis calorimétrico diferencial	XIII-11
13.11. Determinación de ecotoxicidad	XIII-11
13.12. Aplicación de tratamientos microbiológicos	XIII-12
13.12.1. Descripción técnica de la experimentación	XIII-12
13.12.2. Prueba de BPCs aminados como sustrato de crecimiento	XIII-12
13.12.3. Determinaciones analíticas	XIII-14
13.13. Condiciones experimentales del tratamiento aerobio	XIII-14
13.14. Técnica de extracción de metabolitos del medio	XIII-16
13.15. Determinación de la carga orgánica aplicada	XIII-16
13.16. Determinación del rendimiento del proceso de biodegradación	XIII-16
13.17. Microorganismos utilizados	XIII-17
13.18. Medios nutritivos	XIII-18
13.19. Diseño y construcción de reactores	XIII-21
13.19.1. Consideraciones del diseño de los reactores	XIII-21
13.19.2. Descripción de los reactores de biomembrana en el reactor aerobio	XIII-22
13.19.2.1. Reactor aerobio	XIII-22
13.19.2.2. Recipiente o vaso del reactor	XIII-26
13.19.2.3. Soporte	XIII-26
13.19.2.4. Cámara inferior de aireación	XIII-26
13.19.2.5. Cámara superior de recirculación	XIII-27
13.19.2.6. Montaje del soporte	XIII-29
13.19.2.7. Especificaciones de operación de los reactores	XIII-29
13.19.2.8. Sistema de alimentación de agua y micronutrientes	XIII-30
13.19.2.9. Sistema de suministro de oxígeno	XIII-30
13.19.2.10. Lavado de biopelícula	XIII-31
13.20. Diseño y construcción del reactor anaerobio	XIII-33
14. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES	XIV-1
14.1. Rendimiento de la nitración de los estándares comerciales de Aroclor®	XIV-1
14.1.1. Programas de detección de masas de los BPCs nitrados y aminados	XIV-2
14.1.2. Análisis cromatográfico del Aroclor® 1248 nitrado	XIV-4
14.1.3. Resonancia magnética nuclear del Aroclor® 1248 nitrado	XIV-8
14.1.4. Análisis cromatográfico del Aroclor® 1254 nitrado	XIV-10
14.1.5. Resonancia magnética nuclear del Aroclor® nitrado	XIV-12
14.2. Concentración de BPCs en muestras de aceites dieléctricos	XIV-14
14.3. Identificación cromatográfica de BPC puro por CG/EM	XIV-14
14.4. Identificación cromatográfica de BPCs nitrados y aminados por CG/EM	XIV-16
14.5. Determinación de resonancia magnética nuclear de BPCs puros	XIV-22

14.6. Determinación de resonancia magnética nuclear de BPCs nitrados	XIV-25
14.7. Rendimiento del proceso de nitración y aminación de los BPCs extraídos de los aceites dieléctricos	XIV-27
14.8. Caracterización fisicoquímica de los BPCs nitrados	XIV-29
14.8.1. Análisis térmico	XIV-30
14.8.2. Análisis por calorimetría diferencial	XIV-31
14.9. Determinación de ecotoxicidad	XIV-35
14.10. Pruebas de crecimiento de los microorganismos utilizando BPC aminado como única fuente de carbono y nitrógeno	XIV-33
14.11. Análisis del tratamiento aerobio en los bioensayos	XIV-34
14.11.1. Bioensayo con mezcla de bacterias	XIV-35
14.11.2. Bioensayo con <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	XIV-41
14.11.3. Bioensayo con mezclas de hongos	XIV-47
14.11.4. Bioensayo con mezcla de todos los microorganismos	XIV-53
14.11.5. Análisis del tratamiento en los bioensayos	XIV-59
14.12. Descripción de los reactores	XIV-60
14.13. Descripción de las biopelículas desarrolladas en los reactores	XIV-63
14.14. Análisis del tratamiento en el reactor aerobio	XIV-64
14.15. Carga orgánica aplicada en los reactores	XIV-64
14.16. Determinación de metabolitos generados	XIV-65
14.17. Metabolitos generados en el reactor aerobio	XIV-65
14.18. Rendimiento de la biodegradación aerobia	XIV-92
14.19. Metabolitos generados en el reactor anaerobio	XIV-95
14.20. Rendimiento de la biodegradación anaerobia	XIV118
14.21. Otros parámetros determinados en los reactores	XIV120
14.21.1. Determinación de ecotoxicidad	XIV120
14.21.2. pH	XIV121
14.21.3. Temperatura	XIV121
14.21.4. Oxígeno disuelto	XIV122
14.21.5. Demanda química de oxígeno	XIV122
14.21.6. Demanda bioquímica de oxígeno	XIV123
14.21.7. Cloruros	XIV124
14.21.8. Carbono orgánico total	XIV125
15. CONCLUSIONES	XV-1
16. RECOMENDACIONES	XVI-1
17. BIBLIOGRAFÍA	XVII-1
18. ANEXOS	XVIII

Capítulo I.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Los bifenilos policlorados (BPCs) son una familia de compuestos sintetizados comercialmente por cloración directa del bifenilo utilizando cloruro férrico y/o yodo como catalizador; las sustituciones de cloro pueden ocupar 209 posiciones diferentes en la molécula.

Debido a sus principales propiedades fisicoquímicas tales como su baja presión de vapor, baja solubilidad en agua, estabilidad a la oxidación, resistencia al fuego y baja reactividad fueron utilizados como fluidos de transferencia de calor, fluidos hidráulicos, plastificantes, disolventes y fluidos dieléctricos en capacitores y transformadores.

En 1968 se comenzaron a detectar sus efectos nocivos concluyéndose que los BPCs son un peligro potencial para la vida, ya que tienden a bioacumularse y tienen un gran impacto para el ambiente debido a su gran estabilidad y liposolubilidad. Además de causar daños cromosomales, teratogénicos y mortalidad embrionaria en aves y mamíferos, producen también efectos en la piel como el "cloroacne" y síntomas de degeneración neurológica e inmunológica.

Dentro de las principales fuentes de generación de BPCs se encuentran todas las industrias que en el pasado utilizaron estos compuestos como fluidos dieléctricos en transformadores y capacitores. Se ha estimado que durante 50 años fueron producidas 634,200 Tm de BPCs de las cuales, 40,000 Tm residen en la biosfera como contaminantes del suelo, aire, ríos y bioacumulados en animales de vida silvestre (Kimbrough, 1980; Bletchy, 1984). El resto permanecen aún acumuladas en almacenes con poca seguridad y sin ningún tratamiento para su disposición final, lo que ha provocado grandes problemas de contaminación en suelos, arroyos, ríos, lagos, y mantos freáticos.

Actualmente, existen gran cantidad de tratamientos físicos de BPCs pero de muy alto costo; entre ellos, la incineración es uno de los métodos más utilizados; sin embargo, el mal diseño, mala operación o uso inapropiado de tales sistemas, supone una amenaza al ambiente por la emisión de compuestos peligrosos generados durante la mala combustión como por ejemplo, los derivados policlorados de naftalina (PCNs), terfenilos (PCTs), metilbifenilos y dibenzofuranos (PCDFs), los cuales son aún más tóxicos que los BPCs.

Los tratamientos químicos, generalmente utilizan reactivos de base sódica, sodio metálico o mezclas de compuestos orgánicos y sodio; la inconveniencia de estos procesos es la utilización de reactivos altamente peligrosos y su aplicación sólo a muy bajas concentraciones de BPC. Existen además, otros métodos alternativos como los vertederos controlados para residuos contaminados con BPCs, restringidos a casos muy concretos, bajo determinadas condiciones y para concentraciones menores a 500 ppm de BPCs. Este procedimiento sólo está autorizado en determinados países con legislación al respecto; sin embargo, en algunos casos ha planteado problemas de lixiviados.

En lo que respecta a los tratamientos biológicos, las investigaciones realizadas hasta la actualidad han sido desarrolladas aplicando gran variedad de técnicas de biodegradación y aunque se han obtenido buenos resultados, éstos se han presentado como estudios aislados utilizando cepas únicas capaces de degradar solamente un cierto tipo de isómeros; tales reacciones de degradación, están basadas en la producción de enzimas biológicas necesarias para la biodegradación llegando incluso hasta su mineralización.

En los tratamientos con microorganismos anaerobios, el anillo queda intacto mientras se decolora reductivamente la molécula en las posiciones *meta* y *para*. El mayor efecto conseguido con este tipo de tratamiento, es la reducción de la toxicidad de los congéneres más clorados y más tóxicos para los mamíferos dejando la molécula con menos cloros y en posiciones *orto*, las cuales pueden ser fácilmente biodegradados por microorganismos aerobios. En los tratamientos aerobios, los microorganismos oxidan y rompen el anillo del bifenilo por la acción de enzimas peroxidasa en las posiciones 2,3 y 3,4; este tipo de biodegradación es eficaz sólo para congéneres mono a tetraclorados. Todas las investigaciones realizadas, han demostrado que los tratamientos biológicos pueden ser una excelente alternativa económica de eliminación de BPCs.

Actualmente existe una creciente necesidad de investigación que conlleve a soluciones prácticas de problemas de gestión de BPCs. Por lo cual, es de suma importancia el desarrollo y profundización en las líneas de investigación sobre biodegradación que proporcionen alternativas de tratamiento de BPCs ambientalmente aceptables.

A la vista de lo anteriormente expuesto, se consideró necesario abordar el tema con mayor profundidad aprovechando las investigaciones anteriormente realizadas para desarrollar la presente investigación, utilizando un pretratamiento químico de nitración y posterior reducción a amina de la molécula de BPC en posiciones *orto* y *para* con el objeto de "incitar" al microorganismo a utilizar el BPC aminado como fuente de carbono, considerando las interacciones entre el cambio de sus nuevas características fisicoquímicas y el incremento de su capacidad para ser biodegradado, aplicando métodos de tratamiento anaerobio y aerobio en reactores de biomembrana como tecnología de punta; cuyo fenómeno más importante, es la separación de altas concentraciones de BPC y los microorganismos pero permitiendo su paso a través de las membranas hidrófobas de manera dosificada. El rendimiento global del proceso de biodegradación en el reactor aerobio es del 85 %, siendo el 59.9 % para los pentaclorobifenilos, 56.78% para los hexaclorobifenilos y 56.85% para los heptaclorobifenilos presentes en la muestra. En proceso de biodegradación anaerobio el rendimiento global es del 80%, siendo el 63 % para los pentaclorobifenilos, 49.87% para los hexaclorobifenilos y 49.97% para los heptaclorobifenilos.

Los resultados obtenidos de la investigación, confirman la eficiencia de los reactores de biomembrana como una de las tecnologías más atractivas por la reducción de los costos de operación y de inversión; en combinación con el tratamiento de nitración y posterior reducción a amina de la molécula de BPC lo que supone una nueva ruta de actividad metabólica para la degradación de los BPCs.

Capítulo II.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Degradar los bifenilos policlorados presentes en aceites dieléctricos industriales aplicando un pretratamiento químico de nitración y posterior reducción a amina, utilizando reactores de biomembrana como una nueva alternativa de tratamiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar la introducción de grupos nitro y posterior reducción a amina dentro de la molécula de BPC mediante tratamientos químicos.
2. Identificar y caracterizar los compuestos obtenidos en las reacciones de nitración y reducción a amina de los BPCs utilizando los programas existentes de cromatografía de gases/masas y resonancia magnética nuclear y adaptarlos si es preciso.
3. Realizar pruebas de degradación de los BPCs previamente aminados por medio de bioensayos y reactores de biomembrana en fases aerobia y anaerobia.
4. Determinar las condiciones de operación de los reactores que definan el funcionamiento de los procesos de biodegradación de los BPCs aminados.
- 5.- Estudiar la variación de los ciclos de tratamiento, porcentaje y tiempo de reacción de las fases anaerobia y aerobia del proceso de biodegradación.

HIPÓTESIS

El efecto del tratamiento de nitración y reducción a amina de los BPCs mejora considerablemente su posterior biodegradación en reactores de biomembrana en fases aerobia y anaerobia, incrementando el rendimiento.

JUSTIFICACIÓN

Considerando la necesidad de profundizar en el campo de investigación del tratamiento, manejo y control eficaz de los bifenilos policlorados por su alto grado de toxicidad para el medio y la salud pública, es de imperante necesidad el desarrollo de líneas de investigación multidisciplinarias que coadyuven a lograr soluciones prácticas, fundamentadas en la evaluación integral de resultados.

La neutralización de la toxicidad de los bifenilos policlorados ha sido uno de los temas estudiados por muchos investigadores en el campo de la biodegradación, además de la aplicación de tratamientos fisicoquímicos utilizando tecnología avanzada de alto costo.

Con base en las investigaciones reportadas sobre métodos de tratamiento biológicos de BPCs, hasta la fecha realizados, se propone realizar un tratamiento de biodegradación aplicando un pretratamiento químico a la molécula mediante la introducción de grupos nitro y su posterior reducción a amina, con la finalidad de facilitar su biodegradación, utilizando para ello reactores de biomembrana en fases aerobia y anaerobia.

La originalidad e importancia de esta propuesta radica en la utilización del pretratamiento químico de aminación de la molécula de BPC y la utilización de reactores de biomembranas como tecnología de punta.

ALCANCE

Dentro del alcance de la presente investigación se considera realizar la experimentación a nivel de laboratorio, empleando el tratamiento con reactores anaerobios y aerobios de biomembrana tubular en discontinuo. Los reactores serán alimentados con los BPCs previamente nitrados y reducidos a amina.

Capítulo III.

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

3. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

Los Bifenilos Policlorados (BPCs) son compuestos xenobióticos de gran importancia en la actualidad. Fueron sintetizados por primera vez en 1881 pero se empezaron a fabricar industrialmente hasta 1929 en los Estados Unidos de América por sus excelentes propiedades dieléctricas (Cordero, 1995).

Técnicamente, los BPCs son compuestos orgánicos clasificados como hidrocarburos clorados no polares basados en un núcleo de bifenilo (dos anillos bencénicos), con sustitución múltiple de átomos de cloro en uno o en ambos anillos aromáticos, formados por la unión de carbón, hidrógeno y cloro.

El contenido en cloro está estrechamente relacionado con las propiedades fisico-químicas, eléctricas, y toxicológicas, así como su resistencia al fuego (Cordero, 1995; INE, 1995).

3.1. ESTRUCTURA

Los BPCs son un grupo de compuestos derivados del bifenilo; la estructura molecular del radical bifenílico puede incorporar, en las posiciones 2 a 6 y 2' a 6' cierto número de átomos de cloro que va de 1 a 10 sustituyendo a los átomos de hidrógeno; por lo tanto su fórmula general es $C_{12}H_xCl_y$, donde $X=0$ a 9 y $Y=10-X$ (figura III-1).

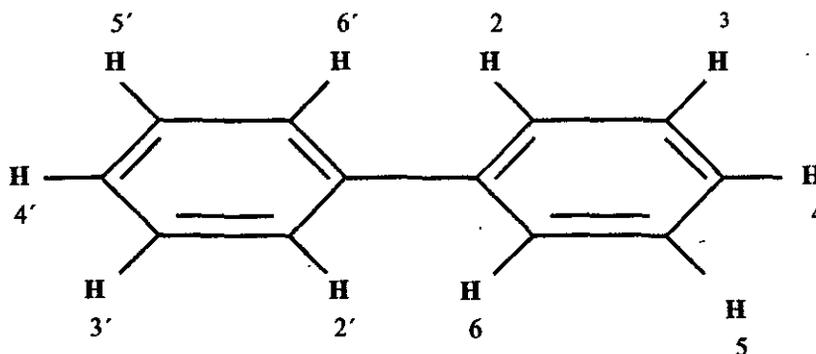


Fig. NO. III-1.-Estructura Molecular de los BPCs.

La masa molecular relativa de los BPCs depende del grado de sustitución de cloro, de tal manera que, el peso molecular del bifenilo monoclorado es de 188 g/mol mientras que el del bifenilo completamente clorado es de 494 g/mol (U.S. EPA, 1980).

3.2. SINTESIS

Las mezclas comerciales fueron sintetizadas por cloración directa de bifenilos con cloro gas en presencia de cloruro férrico y/o yodo como catalizadores, el grado promedio de cloración fue controlado por las condiciones de reacción para producir las propiedades físicas y químicas deseadas (Dobson y VanEsch, 1993).

Los métodos utilizados para la preparación de clorobifenilos individuales incluyen:

- 1) Fenilación o arilación de compuestos aromáticos.
- 2) Reacciones de condensación
- 3) Cloración de bifenilos

Las mayoría de los BPCs, se obtuvieron por reacciones de arilación entre un gran número de compuestos aromáticos como peróxidos de aroilos, ácidos carboxílicos, sales de diazonio, nitrosoaminas, ariltriazenos y fenilhidrazinas. El mecanismo de reacción generalmente involucra radicales libres de los compuestos aromáticos y los radicales precursores de los reactivos utilizados en la reacción. Figura III-2.

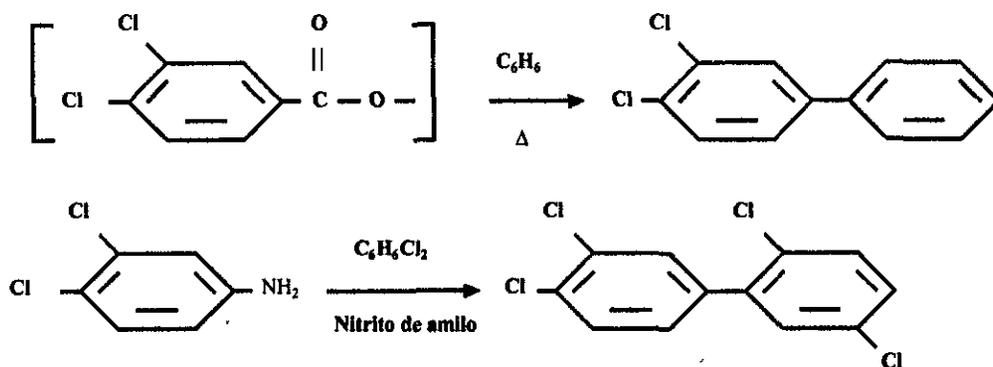


Fig. No. III-2.- Arilación del peróxido de 3,4,-diclorobenzoilo a 3,4-diclorobifenilo.
Arlación de 3,4-dicloroanilina a 2,3',4',5-tetraclorobifenilo (Dobson y VanEsch,, 1993).

Las reacciones de condensación involucran gran número de haluros aromáticos, como: fenilsulfonatos, peróxidos de arilo y anhídridos ácidos, clorobenzenos, y otros compuestos aromáticos, que han sido descritos por Hutzinger et. al. (1974). La condensación de 2 haluros aromáticos en presencia de cobre, es el procedimiento más utilizado para la preparación de bifenilos simétricos. Figura III-3.

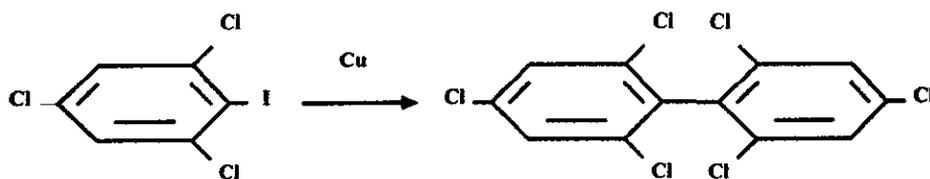


Fig. No. III-3.- (A) Condensación de 2,4,6-tricloroiodobenceno a 2,2',4,4',6,6'-hexaclorobifenilo (Dobson y Van Esch, 1993)

En este procedimiento, el cobre es mezclado con el haluro y calentado por un largo período de tiempo obteniéndose mezclas de clorobifenilos simétricos y asimétricos. figura III-4.

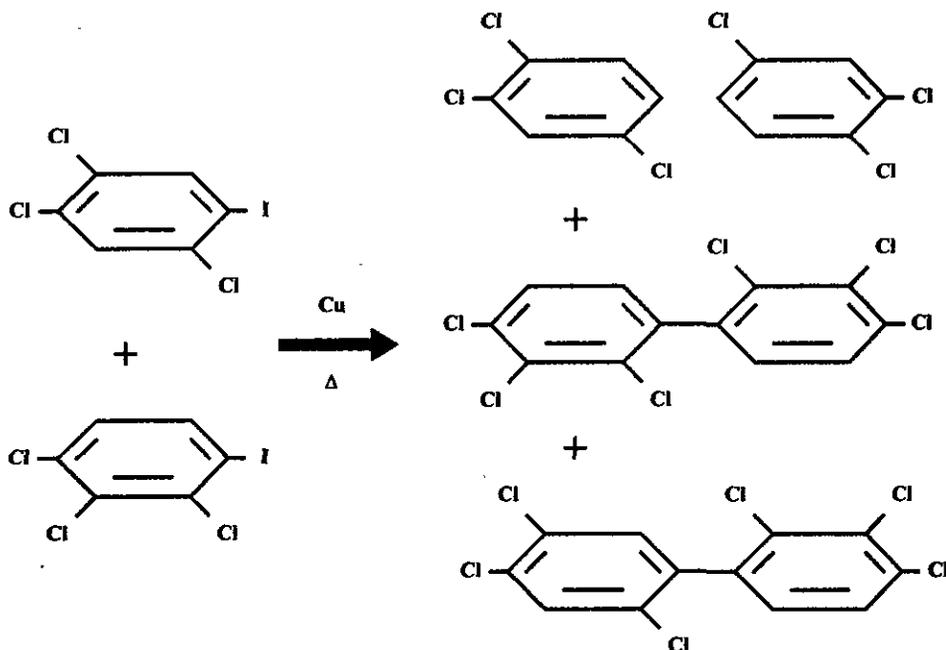


Fig. No. III-4.- (B) Condensación de tricloroiodobencenos a hexaclorobifenilos (Dobson y Van Esch, 1993).

La cloración del bifenilo puede ocurrir por sustitución o adición del Cl⁻ por el H⁺ para formar hexaclorociclohexil bencenos (C₁₂H₁₀Cl₆). Los productos formados por la adición de Cl⁻ son, térmicamente inestables y se descomponen para producir clorobifenilos durante el proceso

de cloración. La cloración directa, produce mezclas de diferentes congéneres de clorobifenilos, dependiendo de la cantidad de cloro, catalizador utilizado y temperatura de la reacción.

Los BPCs se pueden formar a partir de clorobenzenos por reacciones fotoquímicas Figura III-5.

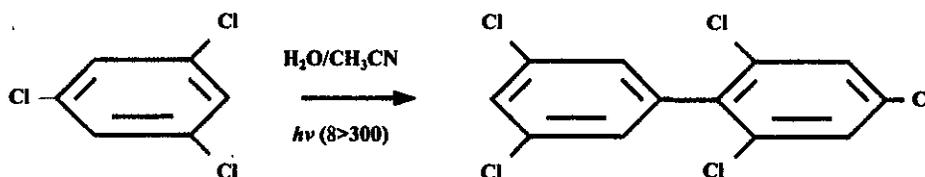


Fig. No. III-5.- Obtención de BPCs por reacciones fotoquímicas (Dobson y VanEsch, 1993)

3.3. NOMENCLATURA

Nombre común: Bifenilos Policlorados (BPCs),
Policloro bifenilos o bifenilos clorados.

Número de Registro CAS: 1336-36-3

Número de registro RTECS: TQ 1350000

Se denominan isómeros al juego completo de las 209 formas de BPCs; de éstos, los congéneres difieren unos de otros en el número de átomos de cloro en la molécula por ejemplo: diclorobifenilos, triclorobifenilos etc. siendo así, diez los congéneres (tabla III-1); de éstos, los homólogos son aquellos con el mismo número de cloros en la molécula; cada uno de los cuales posee un número particular de isómeros que pueden diferir entre si, en la posición de la sustitución (Hutzinger et. al., 1974; Erickson, 1986).

Tabla III-1.- Nomenclatura, número de isómeros, peso molecular y contenido de cloro en BPCs (Kimbrough y Jensen, 1989).

Fórmula estructural	Número (clorobifenilos)	Número de isómeros	Número de isómeros IUPAC	Peso Mol. (g/mol)	Cl (%)	Oxígeno (%)
C ₁₂ H ₆ Cl	Mono	3	1-3	188.65	18.79	3
C ₁₂ H ₄ Cl ₂	Di	12	4-15	233.10	31.77	12
C ₁₂ H ₂ Cl ₃	Tri	24	16-39	257.54	41.30	23
C ₁₂ H ₂ Cl ₄	Tetra	42	40-81	291.99	48.56	41
C ₁₂ H ₂ Cl ₅	Penta	46	82-127	326.43	54.30	39
C ₁₂ H ₄ Cl ₆	Hexa	42	128-169	360.88	58.93	31
C ₁₂ H ₃ Cl ₇	Hepta	24	170-193	395.32	62.77	18
C ₁₂ H ₂ Cl ₈	Octa	12	194-205	429.77	65.77	11
C ₁₂ HCl ₉	Nona	3	206-208	464.21	68.73	3
C ₁₂ Cl ₁₀	Deca	1	209	498.66	71.10	1

3.4. ESTEREOQUÍMICA

De los 209 isómeros, solo cerca de 130 de ellos están presentes en los productos comerciales (Safe, 1990); entre ellos, 19 son los que se encuentran comúnmente en las formulaciones comerciales por ser los más estables a temperatura ambiente (Kaiser, 1974). Existen 78 isómeros que son rotacionales es decir, son enantiómeros el uno del otro (Safe, 1990).

Los anillos fenílicos de una molécula de BPC, no están necesariamente en el mismo plano, es decir, la molécula posee cierta libertad de rotación de uno de los planos fenílicos con respecto al otro, pero los cloros en la posición *orto* (2,2',6,6') restringen la libertad rotacional y en consecuencia, obstaculizan la coplanaridad de los anillos (Figura III-6).

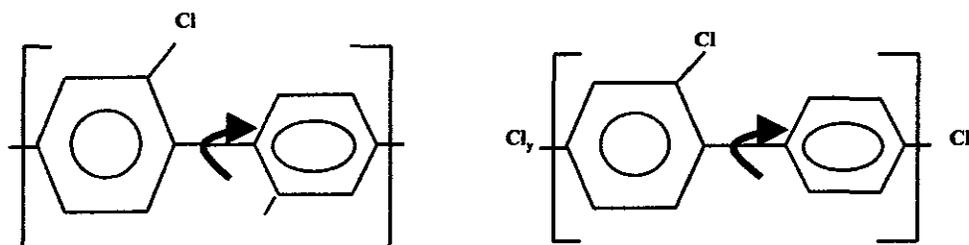


Figura No. III-6.- Estructura de los BPCs coplanares mono- y di-orto sustituidos (Dobson y Van Esch, 1993).

Los estudios cristalográficos de Rayos X han demostrado la preferente conformación "no coplanar" de todos los BPCs incluyendo aquellos "no-orto" sustituidos. La proporción de un isómero particular asumido de configuración coplanar, decrece a medida que se incrementa el grado de sustituciones en la posición *orto*. Frecuentemente, en la literatura biológica los BPCs "no-orto" se citan como planares (o coplanares) y todos los demás como "no planares" (o no coplanares) tabla III-2; esta terminología aunque pueda resultar equívoca, se utiliza con frecuencia por resultar conveniente al referirse a los BPCs más tóxicos (Shaw, 1993; Safe, 1987; Dobson y Van Esch, 1993).

Tabla III-2.- Bifenilos Policlorados planares, mono y di-orto (Shaw, 1993).

Grado de cloración	Planar	Estructura	
		Mono-orto	Di-orto
Tetracloro-	3,3',4,4'		
Tetracloro-	3,4,4',5		
Pentacloro-	3,3',4,4',5	2,3,3',4,4'	
		2,3,4,4',5	
		2,3',4,4',5	
		2',3,4,4',5	
Hexacloro-	3,3',4,4',5,5'	2,3,3',4,4',5	2,2',3,3',4,4'
		2,3,3',4,4',5'	2,2',3,4,4',5

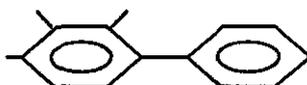
		2,3',4,4',5,5'	2,2',3,4,4',5'
			2,2',4,4',5,5'
			2,3,3',4,4',6
			2,3,4,4',5,6
			2,3',4,4',5',6
Heptacloro-		2,3,3',4,4',5,5'	2,2',3,3',4,4',5
			2,2',3,4,4',5,5'
			2,3,3',4,4',5',6
			2,3,3',4,4',5',6
Octacloro-			2,2',3,3',4,4',5,5'
			2,3,3',4,4',5,5',6

La estereoquímica de las moléculas de los BPCs afecta la fuerza de adsorción de estos compuestos sobre la superficie. Huckins et. al. (1988), ha demostrado que las moléculas de los BPCs pueden ser separadas por cromatografía sobre carbón. La mayoría de las moléculas planares se absorben más fuertemente en comparación con aquellas con forma más irregular; particularmente, los dos anillos fuera del plano, se absorben más débilmente debido a los sustituyentes cloro en las posiciones *orto* que producen este efecto, mientras que los cloros en posiciones adyacentes causan distorsión en los anillos aromáticos (Figura III-7).

Figura III-7.- Coeficientes utilizados para calcular los efectos estéricos (CES) de varios tipos sustitución (Waid, 1986).

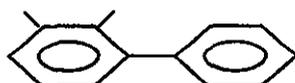
DESCRIPCION	ESTRUCTURA	COEFICIENTE
Tres cloros en las posiciones 2,2', 6'		0.80
Cuatro cloros en las posiciones 2,2',6,6'		0.6
Dos cloros en las posiciones 2,6 ó 2',6'		0.85
Cuatro cloros adyacentes		0.80 (1 anillo) 0.60 (2 anillos)

Tres cloros adyacentes



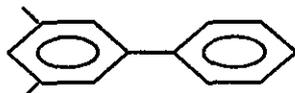
0.95 (1 anillo)
0.60 (2 anillos)

Cloros en las posiciones 3 ó 5 si son adyacentes a cloro en las posiciones 2 ó 6.



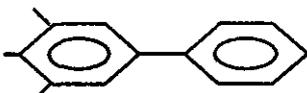
0.95 (1 por molécula)
0.90 (2 por molécula)
0.85 (3 por molécula)
0.80 (4 por molécula)

Cloros en posiciones 3 ó 5 no adyacentes a cloro



0.02 deducido del CES por cada cloro en esta configuración.

Sin cloros en las posiciones 2,2',6,6'



CES es independiente del esquema de sustitución.

Para simplificar la nomenclatura de los BPCs, Ballschmiter y Zell (1980) han propuesto una numeración sistemática que ha sido aceptada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) en el cual, a cada isómero se le ha asignado un número del 1 a 209 tabla III-3 (Dobson y Van Esch,1993).

Tabla III-3.- Numeración sistemática de los isómeros de los BPCs introducida por Ballschmiter y Zell (1980) aceptada por IUPAC.

1	2	43	2,2',3,5	85	2,2',3,4,4'	127	3,3',3,5,5'	169	3,3',4,4',5,5'
2	3	44	2,2',3,5'	86	2,2',3,4,5	128	2,2',3,3',4,4'	170	2,2',3,3',4,4',5
3	4	45	2,2',3,6	87	2,2',3,4,5'	129	2,2',3,3',4,4'	171	2,2',3,3',4,4',6
4	2,2'	46	2,2',3,6'	88	2,2',3,4,6	130	2,2',3,3',4,5'	172	2,2',3,3',4,5,5'
5	2,3	47	2,2',4,4'	89	2,2',3,4,6'	131	2,2',3,3',4,6	173	2,2',3,3',4,5,6
6	2,3'	48	2,2',4,5	90	2,2',3,4',5	132	2,2',3,3',4,6'	174	2,2',3,3',4,5,6'
7	2,4	49	2,2',4,5'	91	2,2',3,4',6	133	2,2',3,3',5,5'	175	2,2',3,3',4,5',6
8	2,4'	50	2,2',4,6	92	2,2',3,5,5'	134	2,2',3,3',5,6	176	2,2',3,3',4,6,6'
9	2,5	51	2,2',4,6'	93	2,2',3,5,6	135	2,2',3,3',5,6'	177	2,2',3,3',4',5,6
10	2,6	52	2,2',5,5'	94	2,2',3,5,6'	136	2,2',3,3',6,6'	178	2,2',3,3',5,5',6
11	3,3'	53	2,2',5,6'	95	2,2',3,5',6	137	2,2',3,4,4',5	179	2,2',3,3',5,6,6'
12	3,4	54	2,2',6,6'	96	2,2',3,6,6'	138	2,2',3,4,4',5'	180	2,2',3,4,4',5,5'
13	3,4'	55	2,3,3',4	97	2,2',3',4,6	139	2,2',3,4,4',6	181	2,2',3,4,4',5,6
14	3,5	56	2,3,3',4'	98	2,2',3',4,6	140	2,2',3,4,4',6'	182	2,2',3,4,4',5,6'
15	4,4'	57	2,3,3',5	99	2,2',4,4',5	141	2,2',3,4,5,5'	183	2,2',3,4,4',5',6
16	2,2',3	58	2,3,3',5'	100	2,2',4,4',6	142	2,2',3,4,5,6	184	2,2',3,4,4',6,6'
17	2,2',4	59	2,3,3',6	101	2,2',4,5,5'	143	2,2',3,4,5,6'	185	2,2',3,4,5,5',6
18	2,2',5	60	2,3,4,4'	102	2,2',4,5',6	144	2,2',3,4,5',6	186	2,2',3,4,5,6,6'
19	2,2',6	61	2,3,4,5	103	2,2',4,5',6'	145	2,2',3,4,6,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
20	2,3,3'	62	2,3,4,6	104	2,2',4,6,6'	146	2,2',3,4',5,5'	188	2,2',3,4',5,6,6'
21	2,3,4	63	2,3,4',5	105	2,3,3',4,4'	147	2,2',3,4',5,6	189	2,3,3',4,4',5,5'
22	2,3,4'	64	2,3,4',6	106	2,3,3',4,5	148	2,2',3,4',5,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
23	2,3,5	65	2,3,5,6	107	2,3,3',4',5	149	2,2',3,4',5',6	191	2,3,3',4,4',5,6

24	2,3,6	66	2,3',4',4'	108	2,3,3',4,5'	150	2,2',3,4',6,6'	192	2,3,3',4,5,5',6
25	2,3',4	67	2,3',4,5	109	2,3,3',4,6	151	2,2',3,5,5',6	193	2,3,3',4',5,5',6
26	2,3',5	68	2,3',4,5'	110	2,3,3',4',6	152	2,2',3,5,5',6	194	2,2',3,3',4,4',5,5',6
27	2,3',6	69	2,3',4,6	111	2,3,3',5,5'	153	2,2',4,4',5,5'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
28	2,4,4'	70	2,3',4',5	112	2,3,3',5,6	154	2,2',4,4',5,6'	196	2,2',3,3',4,4',5',6
29	2,4,5	71	2,3',4',6	113	2,3,3',5',6	155	2,2',4,4',6,6'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
30	2,4,6	72	2,3',5,5'	114	2,3,4,4',5	156	2,3,3',4,4',5	198	2,2',3,3',4,5,5',6
31	2,4',5	73	2,3',5',6	115	2,3,4,4',6	157	2,3,3',4,4',5'	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
32	2,4',6	74	2,4,4',5	116	2,3,4,5,6	158	2,3,3',4,4',6	200	2,2',3,3',4,5',6,6'
33	2',3,4	75	2,4,4',6	117	2,3,4',5,6	159	2,3,3',4,5,5'	201	2,2',3,3',4',5,5',6
34	2',3,5	76	2',3,4,5	118	2,3',4,4',5	160	2,3,3',4,5,6	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
35	3,3',4	77	3,3',4,4'	119	2,3',4,4',6	161	2,3,3',4,5',6	203	2,2',3,4,4',5,5',6
36	3,3',5	78	3,3',4,5	120	2,3',4,5,5'	162	2,3,3',4',5,5'	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
37	3,4,4'	79	3,3',4,5'	121	2,3',4,5',6	163	2,3,3',4',5,6	205	2,3,3',4,4',5,5',6
38	3,4,5	80	3,3',5,5'	122	2,3,3',4,5	164	2,3,3',4',5,6	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
39	3,4',5	81	3,4,4',5	123	2',3,4,4',5	165	2,3,3',5,5',6	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
40	2,2',3,3'	82	2,2',3,3',4	124	2',3,4,4',5	166	2,3,4,4',5,6	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
41	2,2',3,4	83	2,2',3,3',5	125	2',3,4,5,5'	167	2,3',4,4',5,5'	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'
42	2,2',3,4'	84	2,2',3,3',6	126	3,3',4,4',5	168	2,3',4,4',5',6		

Los números 28, 52, 101, 138, 153y 180 son los isómeros más utilizados como representativos para la cuantificación de mezclas comerciales de BPCs.

En los productos comerciales y ciertas muestras de ambientes contaminados con BPCs, suelen existir impurezas de otros compuestos clorados con propiedades similares a ello, tales como los policloro dibenzofuranos (PCDFs), policloro dibenzo dioxinas (PCDDs) y compuestos bromo clorados; cada grupo de estos compuestos puede contener mezclas complejas de compuestos individuales capaces de interferir en la determinación analítica de los BPCs (Nose, 1972).

3.5. PROPIEDADES

Los isómeros de BPCs puros son incoloros, los mono y diclorobifenilos son cristalinos pero los productos comerciales de BPCs que son mezclas de éstos, son de color débilmente amarillentas o amarillo obscuro que no cristalizan aún en bajas temperaturas. Se les suele encontrar en las resinas en estado sólido; las mezclas de tri, tetra, penta y hexaclorobifenilos incrementan su viscosidad en función del contenido de cloro en un rango de -22°C a +18°C. Debido a los átomos de cloro en la molécula su densidad es muy alta (Ullmann, 1990).

Los BPCs, poseen una temperatura de ignición muy elevada, el punto de fusión de los isómeros puros varía entre 18 °C y 149 °C (Advance Refinery Technology, 1990; Alhigen y Jensen, 1970) llegan a formar vapores más pesados que el aire, pero no forman mezclas explosivas en contacto con el aire. Cuando se queman en presencia de aire, producen hollín y cloruro de hidrógeno (Alford-Stevens et.,al., 1986).

Poseen una conductividad eléctrica muy baja, alta conductividad térmica y alta resistencia a saltos térmicos. Son químicamente muy estables bajo condiciones normales y muy resistentes a un amplio rango de oxidantes químicos. Aunque son estables aún en presencia de oxígeno

atmosférico y algunos metales, a temperaturas superiores a los 170 °C pueden ser hidrolizados a oxibifenilos con soluciones de hidróxido de sodio en temperaturas de 300 °C a 400 °C y altas presiones, pero pueden llegar a producirse durante éste proceso (PCDFs) policloro dibenzo furanos (Ulmans, 1990; Dobson y Van Esch, 1993).

Los BPCs, pueden ser completamente fotodegradados bajo condiciones de laboratorio. La principal reacción que se produce utilizando solventes polares es la decloración reductiva preferentemente de las posiciones *meta*; otra importante reacción, es la metoxilación en metanol (introducción de oxígeno en el anillo) (Hutzinger et. al., 1974).

Los BPCs son solubles en grasas, aceites y en la mayoría de los solventes orgánicos no polares (principalmente hidrocarburos) en especial cuando se calientan, pero son insolubles en glicerol y glicoles (Kimbrough y Jensen, 1989); poseen muy baja solubilidad en agua (50 µg/l), que puede incrementarse exponencialmente con un rango de temperatura que va de 0.4 a 80° C (Doucette y Andrew, 1988; Dickhut et. al, 1986). La tabla III-4.- presenta algunas propiedades físicas y químicas de 6 mezclas de Aroclors[®] (Alford-Stevens et. al., 1986).

El punto de ebullición se encuentra en rangos que van de 350 °C a 480 °C; la presión de vapor calculada a partir de su solubilidad (mol/m³) y la constante de Henry (atm.m³/mol), generalmente decrece con el peso molecular y se incrementa conforme aumenta el grado de sustituciones en la posición *orto* (Dunnivan y Elzerman, 1988; Hawker, 1989).

Para los isómeros de BPCs, la constante de Henry es independiente de la masa molecular y se incrementa en un orden de magnitud con cada incremento de 25 °C.

Las pérdidas por evaporación son despreciables, el porcentaje de pérdidas por evaporación es de 1.5 % para los isómeros menos clorados y menor del 0.1% para los más clorados (en un período posterior a 6 horas a 100 °C) (Kimbrough y Jensen, 1989).

La temperatura de ignición mayor es de 180 °C para los congéneres de bajo contenido de cloro; poseen gran inercia química, son insensibles a la acción de la luz y son poco higroscópicos (WHO/EURO, 1987)

Los estudios realizados en estuarios, han demostrado que la hidrofobicidad y la solubilidad acuosa de los BPCs muestra una relación lineal entre el logaritmo del coeficiente de la actividad acuosa o Superficie de Área Total (TSA) y el Volumen Molecular Total (TMV) (Opperhuizen y Voors, 1988).

Los BPCs poseen una viscosidad elevada, sus densidades varían entre 1,3 y 1,6 g/cm.³ El incremento del contenido de cloro en la molécula, provoca un aumento de la densidad, la viscosidad y el punto de ignición hasta llegar hacerlo no determinable, disminuyendo también la constante dieléctrica.

Las principales propiedades eléctricas de la mayoría de los Aroclors[®] son la resistividad, cercana a los 5x10¹¹ Ω/cm medida bajo las siguientes condiciones: 8 cm a 100 °C, 500 V; su fuerza dieléctrica sobre los 35 kV y el factor de poder (a 100 °C, 1000Hz) de menos de 0.1% (Kimbrough y Jensen, 1989).

Tabla III-4.- Características de las mezclas de Aroclor® (Kimbrough y Jensen, 1989).

1221	1.18	30-31	1.618	141-150	176	1	275-320	1,740			
1232	1.26	31-32	1.621	152-154	238	-35	270-325	874	5.7	4.6	
1016	1.37		1623	170	ntb		323-356				
1242	1.38	34-35	1.628	176-180	ntb	-19	325-366	338	5.8	4.9	240
1248	1.44	3636	1.631	193-196	ntb	-7	340-375	152	5.6	4.6	52
1254	1.54	44-58	1.640	ntb ^a	ntb	10	365-390	53	5.0	4.3	12
1260	1.62	72-78	1.648	ntb	ntb	31	385-420	13	4.3	3.7	3
1262	1.64	86-100	1.651	ntb	ntb	35-38	390-425	9			
1268	1.81			ntb	ntb		435-450		2.5		

^a ntb = sin ebullición

^b Estimado.

El proceso de partición de los BPCs, de particular importancia en los problemas ambientales observados están basados principalmente en la determinación de los coeficientes de partición de octanol/agua y la solubilidad acuosa (Tabla III-5). El coeficiente de partición octanol/agua (K_{wo}) (Tabla III-6) mide el grado de repartición de un compuesto entre la fase orgánica (octanol) y el agua; sirve para estimar la cantidad de BPC que será absorbida por los organismos acuáticos. Este coeficiente es muy útil para determinar el destino y transporte de los BPCs en el ambiente, y está relacionado con los coeficientes de absorción del suelo (K_p), (parámetro por el que se determina la capacidad de los BPCs para ser adsorbidos en el suelo o sedimento); el coeficiente de partición de carbono orgánico (K_{oc}) y el factor de bioconcentración (FBC) (que determina la cantidad de BPC susceptible de acumularse en los organismos acuáticos y que esta en función a su vez, del contenido de lípidos del tejido animal) (LaGrega et. al., 1996).

El coeficiente de partición de octanol/agua del BPC es la medida de su hidrofobicidad, y es el parámetro más utilizado para predecir la extensión de su bioconcentración en los organismos (Dobson y Van Eşch, 1993). Debido a que los BPCs son compuestos no polares poseen una muy baja solubilidad, un alto coeficiente octanol/agua y un alto coeficiente de absorción que los hace resistentes a la degradación y altamente acumulables. Existe una correlación entre el factor de bioconcentración (K_b) dado por la tasa de concentración en los organismos acuáticos y la concentración en equilibrio presente en el agua, con el coeficiente de partición de octanol/agua como se muestra a en la tabla III-7.

Por otra parte, las constantes de Henry, describen el equilibrio de distribución entre las fases de vapor y acuosas utilizadas en las predicciones de las principales propiedades ambientales de los BPCs; la mayoría de los BPCs poseen muy baja presión de vapor que decrece conforme se incrementa el grado de cloros en la molécula (Shaw, 1993).

Tabla III-5. Valores de solubilidad en agua para BPCs^a (Shaw, 1993).

Monocloro bifenilo	1,000-6,000
4,4'- dicloro bifenilo	50-200
Otros dicloro bifenilos	1,000-1,500
Tricloro bifenilos	50-100
Tetracloro bifenilos	30- 100
Pentacloro bifenilos	20-50
Hexacloro bifenilos	0.1-10

^a Debido a inexactitudes en las medidas se observan grandes diferencias en los valores

Tabla III-6.- Valores de K_{wo} Para algunos congéneres de BPCs (Kamlet et. al., 1988).

Bifenilo	3.90	3.98
2- mono- CB	4.30	4.46
2,5-di- CB	5.10	5.08
2,6-di-CB	5.00	4.95
2,4,5-tri-CB	5.60	5.52
2,4,6- tri- CB	5.50	5.59
2,3,4,5- tetra- CB	5.91	5.92
2,2,4,5- tetra- CB	5.73	5.95
2,3,4,5,6- penta- CB	6.30	6.45
2,2',4,5,5'- penta- CB	6.40	6.62
2,2',3,3',6,6'-Hexa- CB	6.70	7.09
2,2',3,3',4,4'-Hexa- CB	7.00	6.81
2,2',4,4',6,6'-Hexa- CB	7.00	7.20
2,2',3,3',4,4',6- Hepta- CB	6.70	7.34
2,2',3,3',5,5',6,6'-Octa- CB	7.10	8.12
2,2',3,3',4,5,5',6,6'-Nona-CB	8.16	8.52
2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-Deca-CB	8.26	8.92

Tabla No.III-7.- Valores del factor de bioconcentración (Kamlet et. al.,1988)

Tasa de concentración	Tipo de congéneres
$\text{Log } K_b = 0.56 \text{ log } K_{ow} + 0.124$	Triclorados
$\text{Log } K_b = 0.85 \text{ log } K_{ow} - 0.70$	Tetraclorados
$\text{Log } K_b = 1.119 \text{ log } K_{ow} - 1.579$	Pentaclorados
$\text{Log } K_b = 0.76 \text{ log } K_{ow} - 0.23$	Hexaclorados

Las tablas III-8 y III-9 presentan de manera resumida las principales propiedades ambientales de los congéneres y mezclas comerciales de BPCs; los datos para los congéneres puros fueron obtenidos de las siguientes referencias: presión de vapor (Foreman y Bidleman, 1985); solubilidad en agua (Brodsky y Ballschmiter, 1988); coeficiente de partición octanol/agua (Brodsky y Ballschmiter, 1988; Duccette y Andre, 1988); constante de Henry (Dunnivant y Elzerman, 1988b); espectro de absorción UV/Vis (Hutzinger et. al., 1974).

Tabla III-8.- Rangos de las principales propiedades ambientales de BPCs (Hutzinger et. al., 1974)

Cl/molécula	Peso molecular ^a	Prom. del peso	Solubilidad (mg/l)	Promedio de vapor (P/P ₀)	P ₀ (mmHg)
1	188.04	188.7	1.3.10 ⁻³ -7.10 ⁻³	2.2.10 ⁻³ -9.2.10	4.6-4.7
2	222.00	223.1	6.10 ⁻² -7.9.10 ⁻²	3.7.10 ⁻² -7.5.10	5.2-5.3
3	255.96	257.6	1.10 ⁻² -6.4.10 ⁻²	1.1.10 ⁻² -1.3.10	5.7-6.1
4	289.92	292.0	2.10 ⁻² -1.7.10 ⁻²	1.8-4	5.9-6.7
5	323.88	326.4	4.5-12	5.3-0.8.8	6.4-7.5
6	357.84	360.9	0.4-0.9	1.9-0.2	6.4-7.6
7	391.81	395.3	0.5	0.53-4.8.10 ⁻²	7.0-7.7
8	425.77	429.8	0.2-0.3	7.8.10 ⁻² -9.10 ³	7.0-7.6
9	459.73	464.2	0.1	3.2.10 ⁻² -1.1.10	7.7-7.9
10	493.69	498.7	0.02	5.6.10 ⁻³	8.4

^a Basado en Cl³⁵ (34.969) y Cl³⁷ (12.000)

^b Promedio de peso molecular basado en la abundancia natural de cloro, carbono e hidrógeno

S_w = solubilidad en agua; P = Vapor de presión

Tabla III-9.- Propiedades ambientales por mezcla de Aroclor^a (WHO/EURO, 1987)

Aroclor	Solubilidad (mg/l) a 25 °C	Vapor de presión (O ₂) a 25 °C	Densidad (g/ml) a 25 °C	C ₀ /H ₀ (mg/m ³ /mol)	Constante de Henry (atm·m ³ /mol)	Rango de distribución (10 ³)
1016	0.42	4.0.10 ⁻⁴	1.33	2.9.19 ⁻⁴	1.6215-1.6235 ^d	325-356
1221	0.59 ^c	6.7.10 ⁻³	1.15	3.5.10 ⁻³	1.617-1.618 ^e	257-320
1232	0.45	4.1.10 ⁻³	1.24	---	---	290-325
1242	0.24	4.1.10 ⁻³	1.35	5.2.10 ⁻⁴	1.627-1.629 ^e	325-366
1248	0.054	4.9.10 ⁻⁴	1.41	2.8.10 ⁻³	---	340-375
1254	0.021	7.7.10 ⁻³	1.50	2.0.10 ⁻³	1.6375-1.6415 ^d	365-390
1260	0.0027	4.0.10 ⁻⁵	1.58	4.6.10 ⁻³	---	385-420

^a IARC,(1978); WHO/EURO (1987); ATSDR (1989)

^b La constante de Henry estimada es un promedio de las mezclas completas.

^c a 24 °C; ^d a 25 °C; ^e a 20 °C

3.6. MEZCLAS COMERCIALES

Las mezclas comerciales de BPCs son complejas, contienen diferentes cantidades en número y tipo de congéneres (isómeros dentro de una familia de compuestos, además de trazas de impurezas).

En las fórmulas comerciales, los últimos dos dígitos de la clave numérica utilizados con el nombre comercial, indican el porcentaje de cloro en cada mezcla por ejemplo: el nombre de Aroclor[®] 1242 está constituido por cuatro dígitos, en los cuales los dos primeros (12) indican el número de carbonos de bifenilo y los otros dos, el porcentaje promedio de cloro (tabla III-10); por lo tanto, el Aroclor[®] 1242 contiene el 42 % por peso de Cl, correspondiendo a un promedio de cerca de tres átomos de cloro por molécula de bifenilo.

Tabla III-10.- Contenido de cloro y número de registro del Chemical Abstract (CAS) de las diferentes tipos de Aroclor®

Aroclor	Cl/molécula	% Cl	Nº CAS
1016	2.5	38	12674-11-2
1221	1.25	21	11104-28-2
1232	2	32-33	11141-16-5
1242	3	40-42	53469-21-9
1248	4	48	12672-29-6
1254	5	52-54	11097-69-1
1260	6-6.5	60	11096-82-5
1262	6.8	62	37324-23-5
1268	8.7	68	11000-14-4

Los Aroclors®, se clasifican en cuatro grupos en función del porcentaje de cloro: con 21 %, 42 %, 54 %, y con 60 % de contenido en cloro, aunque existen también los de 62 y 68% (Cordero, 1995); una excepción a esta generalización es el Aroclors® 1016, que es un producto de destilación del Aroclor® 1242 conteniendo solo 1 % de componentes con 5 o más átomos de cloro (Burse et. al., 1974).

En otros productos comerciales, los códigos indican el número aproximado de cloro en los componentes; por ejemplo el Clophen® A60, Phenclor® DP6 y Kanechlor® 600 son bifenilos con un promedio de 6 átomos de cloro por molécula (equivalente al 59% de cloro en peso) (Dobson y Van Esch, 1993).

En cambio, en el Delor® 103 la composición se ha designado con tres dígitos, los dos primeros (10) indican el tipo de molécula y el tercero es el número promedio de átomos de cloro en la molécula, siendo los Delor® 103 y 106 los producidos en mayor cantidad (Alford-Stevens; et. al., 1985).

Todos estos productos comerciales no fueron vendidos de acuerdo a las especificaciones de composición, sino de acuerdo a sus propiedades físicas (tabla III-11). Los productos más importantes son las mezclas cuyos principales componentes son los tri, penta y hexaclorobifenilos (los números 28, 52, 101, 138, 153 y 180 de la UIPAC son los que se encuentran en mayor proporción en las principales mezclas de BPCs) (VDLUFA, 1985; Dobson y Van Esch, 1993).

Tabla III-11.- Comparación de varias series de mezclas de BPCs comerciales (Dobson y Van Esch, 1993)

Nombre Comerciales							Promedio de Cloro Por Molécula	% de peso de Cloro Aprox.
Aroclor	Clophen	Phenclor	Pyralene	Kanechlor	Phenclor	Delor		
1221							1.15	21
1232			2000	200			2	32-33
			1500				2.5	38
1242	A30	DP 3	3000	300	42	2	3	40-42
1248	A40	DP 4		400		3	4	48

1254	A50	DP 5		500	54	4;5	5	52-54
1260	A60	DP 6		600	64*		6-6.3	60
1262							6.8	62
					70*		7.7	65
1268							8.7	68
1270							9.5	70
					DK		10	71

* Los dos últimos dígitos deberían indicar el % en peso de Cloro sin embargo, esto no corresponde con las especificaciones del fabricante.

La tabla III-12 presenta las proporciones de BPCs con 1 a 9 cloros sustituidos en el Aroclor®. (expresado de acuerdo al porcentaje de cloro por peso) y la composición de los patrones de sustitución (expresado en % mol) (Dobson y Van Esch, 1993). La tabla III-13 presenta la comparación del porcentaje en peso y número de cloro en la molécula de una serie de productos comerciales de BPCs (Kimbruogh y Jensen, 1989).

Tabla III-12.- Composición promedio y porcentaje en peso de Cloro en diferentes tipos de Aroclor® (Kimbruogh y Jensen, 1989).

Aroclor	% Cl.	Bifenilo	Cloro							
1221	21	10	50	35	4	1				
1232	32-33		26	29	24	15				
1016	38		2	19	57	22				
1242	40-42		1	13	45	31	10			
1248	48			1	2	49	27	2		
1254	52-54				1	15	53	26	4	
1260	60						12	42	38	7

Tabla III-13.- Porcentajes aproximados de Cloro (peso/vol) y diferentes grados de cloración de varios Aroclors® (WHO EURO, 1987).

Número de Átomos de Cloro en la Molécula	Porcentaje en peso de Cloro	Tipo de Aroclor						
		1221	1232	1016	1242	1248	1254	1260
0	0	10	-	-				
1	18.8	50	26	2	3			
2	31.8	35	29	19	13	2		
3	41.3	4	24	57	28	18		
4	48.6	1	15	22	30	40	11	
5	54.4				22	36	49	12
6	59.0				4	4	34	38
7	62.8						6	41
8	66.0							8
9	68.8							1

3.7. PRODUCCIÓN

Los BPCs fueron sintetizados por primera vez en 1881 por Schmitdt y Schultz (tabla III-14) pero no fueron producidos comercialmente sino hasta comienzos de 1929 en los Estados

Unidos (Alford-Stevens et. al, 1985). La estimación de la cantidad total de BPCs producidos desde 1929 es aproximadamente 1.5 millones de toneladas métricas (Kimbrough y Jensen, 1989).

Tabla III-14.- Nombres de los productos comerciales (Brinkman et. al., 1980; WHO/EURO, 1987).

Nombres de los productos comerciales que contienen BPCs y equipo en que fueron utilizados		
Acelos (t)	Bakola 131 (t,c)	Hydol (t,c)
Apirolio (t,c)	Biclor (c)	Inerteen (t,c)
Aroclor (t,c)	Chlorextol (t)	Kanechlor (t,c)
Diesconon (c)	Chlorinol	Montar
Dk (t,c)	Chlophen (t,c)	Nepolin
Duconol (c)	Chlorphen (t)	No-Flamol (t,c)
Dykanol (t,c)	Delor	Phenoclor (t,c)
Pydraul*	Diaclor (t,c)	Saf-T-Kuhl (t,c)
Pyralene (t,c)	Dialor (c)	Santotherm FR**
Pyranol (t,c)	EEC-18	Santovac 1 y 2
Pyroclor (t)	Elmex (t,c)	Siclonyl (c)
Arubren	Eucarel	Solvol (t,c)
Asbestol (t,c)	Fenchlor (t,c)	Sovol
Askarel (t)	Hivar (c)	Therminol FR**

* Previo a los productos de la serie (serie-fr) utilizado como aceite contaminado con BPC, pero existen productos que no contienen BPCs.

** Previo a los Productos de la (Serie A) por ejemplo Pydraul A-200 contaminado con BPCs, pero las series b,C, o D no contienen compuestos clorados.

(T) Utilizado en Transformadores

(c) Utilizado en Capacitores.

La producción comercial de BPCs en los Estados Unidos se inició en 1929 por la compañía *Swan Chemical* y en 1935 ésta fue comprada por la compañía *Monsanto Industrial Chemicals* (St. Louis, MO), quienes produjeron todas las mezclas de bifenilos clorados conocidos bajo el nombre de Aroclor® y Pyrochlor® y fue a mediados de 1971, cuando se introdujo en el mercado el Aroclor® 1016 como el fluido dieléctrico más biodegradable para ser utilizado en capacitores (Durfee et. al., 1976; Burruss, 1977; Bletchly, 1985).

De la producción total de BPCs en el Japón a partir de 1954, el 98% se produjo por la compañía *Kanegafuchi Chemical* (Tokio) que distribuyó la mezcla comercial de BPCs bajo el nombre de Kanechlor®. Además en 1969, la compañía *Mitsubishi Monsanto* (Tokio) inició su producción, la cual continuó hasta su prohibición en 1972, con el nombre comercial de Arochlor® y Santotherm® (Tatsukawa, 1976; Bletchly, 1985).

Los BPCs en Francia fueron producidos por las compañías *Rhône Poulenc* y *Atochem* (anteriormente llamada PCUK). Los productos fueron vendidos por la firma *Prodelec* (París) bajo los nombres comerciales de Phenochlor® y Pyralène®. La producción de BPCs hasta 1989 fue aproximadamente de 4000 toneladas anuales (Bletchly, 1985).

En la República Federal Alemana, los BPCs empezaron a producirse desde 1930 hasta 1983, por la compañía *Bayer AG* (Leverkusen) bajo el nombre comercial de Clophens® y Elaol® (Kimbrough y Jensen, 1989; Bletchly, 1985).

Los BPCs en Italia fueron producidos desde 1958 hasta 1983 por la compañía *Caffaro* bajo los nombres comerciales de Fenclor® y Apirolio®; la mayor producción de decacloro bifenilos en grado técnico fue comercializada bajo el nombre de Fenclor DK® (Bethcly, 1985).

La única planta productora de BPCs en España estaba localizada en Flix, (Tarragona) y pertenecía a una asociación entre las compañías *Cros S.A.* y *Rhône-Poulenc*; las mezclas fueron producidas bajo la licencia y permiso francés y comercializado bajo el nombre de *Pyralene®* o *Fenoclor®*, los productos fueron etiquetados con el nombre de *Rhône-Poulenc España* (Kimbrough y Jensen, 1989; Bletchly, 1985).

En Reino Unido, la compañía *Monsanto* empezó a producir en 1954 BPCs para el mercado Europeo en la fábrica de Newport bajo el nombre comercial de *Pyroclor®* finalizando su producción en 1977 de acuerdo con la prohibición de producción de la compañía *Monsanto americana* (Kimbrough y Jensen, 1989; Bletchly, 1985).

Según los registros de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) la producción total de los países miembros asciende a 647,000 toneladas aproximadamente (tabla III-15) (Bletchly, 1984 y 1985; Kimbrough y Jensen, 1993).

Tabla III-15.- Producción (Tm) de BPCs en los países miembros de la OCDE (Bletchly 1984 y 1985; Kimbrough y Jensen, 1989).

	Hasta 1954	1955-1969	1970-1974	1975-1979	1980-1984	Total
Francia	2.800	7.085	14.401	16.975	25.759	116.721
E.P.A.	7.200	8.125	22.456	29.429	36.343	114.052
Italia	-	520	1.920	4.430	7.195	28.008
Japón	-	150	1.289	4.296	9.433	28.964
Reino Unido	100	2.042	10.215	22.973	22.017	66.848
U.S.A.	200	3.960	10.530	24.750	19.879	59.319
Resto del mundo	172.000	68.000	94.500	166.300	114.000	647.000
OCDE						1060.912

En Europa de Este, los BPCs se fabricaron de 1934 a 1984 en Polonia, Checoslovaquia, Alemania Oriental y la URSS por la compañía *ChemKo Company* (Strazske, Checoslovaquia) y vendidos bajo el nombre comercial de *Delor®*, *Delorene®* y *Hydelor®* con una producción de 6000 Toneladas anuales. También la compañía *Chemapol Pzo* (Praga) los produjo, así como también la compañía *Deutsche Soda Werken-VEB* (Westerbregeln) bajo el nombre comercial de *Orophene®* y en la URSS se distribuyeron como *Sovol®* y *Sovtol®* (Kimbrough y Jensen, 1989).

3.8. APLICACIONES

Tradicionalmente, la utilización más importante de los BPCs ha sido en "sistemas cerrados"; éstos incluyen los fluidos dieléctricos de los transformadores, capacitores, condensadores eléctricos, fluidos de transferencia de calor y fluidos hidráulicos que utilizan BPCs como aislantes por su estabilidad sin deterioro cuando se exponen al aire y calentamiento. Para disminuir su viscosidad en estos sistemas, los BPCs se mezclaron mezclados con diferentes solventes como tri y tetraclorobencenos producto que en conjunto, recibe el nombre de *Askarel* (no arde) (Kimbrough y Jensen, 1989).

Su amplia utilización en equipos eléctricos se debió principalmente al desconocimiento de sus efectos nocivos; su carácter ignífugo, que reducía el riesgo de incendio con respecto al aceite puro hasta entonces utilizado; incluso esta propiedad, motivó que las compañías de seguros redujeran las primas de seguro de las instalaciones en las que los transformadores contenían BPCs y se redujeron los costos de instalación ya que no se necesitaban grandes medidas de control contra incendios; adicionalmente, los equipos eran de menor tamaño.

Además de la aplicación dieléctrica se utilizaron también en "sistemas abiertos" en los cuales se utilizaron como refrigerantes. Por su gran poder adhesivo y plastificante, se usaron en la fabricación de tintas, cartoncillos, materiales de empaque, pinturas, adhesivos, recubrimientos para papel, pegamentos, envases de cartón, papel carbón para copia, plásticos, insecticidas, ceras, aditivos en cementos, agentes de fundición, retardantes de fuego y aceites de inmersión (Kimbrough y Jensen, 1989).

En los Estados Unidos, los inventarios de la aplicación de los BPCs fue aproximadamente del 61 % en sistemas cerrados, 26% en sistemas abiertos y 13% en sistemas cerrados nominales según lo muestra las tabla III-16, III-17 y III-18 de los países miembros de la OCDE que realciona los tipos de productos en los que fueron aplicados.

Tabla III-16.- Principales aplicaciones de los Aroclors® (Kimbrough y Jensen, 1989)

Categoría	Usos	Tipo de Aroclor
Sistemas cerrados	Capacitores Transformadores	1016,1221,1254 1242,1254,1260
Sistemas cerrados nominales	Lubricantes Fluidos hidráulicos Fluidos de transf. de calor.	1221,1242 al 1254 1232 al 1260 1242
Sistemas de aplicación abierta	Plastificantes en gomas. Plastificantes en resinas. Papel carbón para copias. Adhesivos. Ceras. Tinta.	1221 al 1254 y 1268 1248 al 1268 1242 1221 al 1254 1242, 1254 y 1268 1254.

Tabla III-17.- Ventas en Norte América de BPCs por tipo de Aroclor® y categoría de uso (en Lb X10⁶).

Año	Tipo de Aroclor						Categoría de Uso	
	1016	1221	1242	1254	1260	Otros	Sistemas cerrados	Otros usos
1957	0	18.2	1.2	4.5	7.6	0.3	30.0	2.3
1958	0	10.4	2.6	6.7	6.0	0.4	19.8	6.2
1959	0	13.6	3.4	6.8	6.6	1.0	22.4	8.9
1960	0	18.2	2.8	6.1	7.3	0.8	24.9	10.3
1961	0	19.2	4.0	6.3	6.5	0.9	22.2	15.3
1962	0	20.7	3.5	6.3	6.6	1.0	22.3	14.7
1963	0	18.5	5.0	5.9	7.6	1.1	22.9	15.2
1964	0	23.6	5.2	6.3	8.5	1.2	27.5	17.4
1965	0	31.5	5.6	7.7	5.8	1.1	32.4	19.4
1966	0	39.6	5.0	7.0	5.9	1.6	37.8	21.3
1967	0	43.1	4.7	6.7	6.4	1.6	40.8	21.7

1968	0	44.9	4.9	8.9	5.3	1.2	41.1	24.0
1969	0	45.5	5.7	9.8	4.4	1.8	37.1	30.1
1970	0	48.6	4.1	12.4	4.9	3.1	40.5	32.6
1971	3.3	22.0	0.2	4.7	1.7	2.4	25.2	9.1
1972	20.9	0.7	0.8	3.5	0.3	0.2	25.7	0.7
1973	23.0	6.2	0	8.0	0	<0.1	37.7	0
1974	22.0	6.2	0	6.2	0	<0.1	34.4	0
1975 ^c	14.6	8.8	0	8.5	0	<0.1	31.9	0

^a Aroclor 1221 + 1232 + 1260 + 1268.

^b Transformadores y capacitores.

^c Valores estimados.

Tabla III-18.- Registros de aplicación de BPCs en los países miembros de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) (Bletchly, 1984 y 1985; Kimbrough, 1980).

País	Cantidad de BPC en uso			Equipos con BPC en uso		Cantidad de BPC en toneladas		Porcentaje de BPC en uso y almacenados en equipos pequeños y capacitores	Uso de BPC en (1985)
	Transformadores	Capacitores Grandes Pequeños	-L	Transformadores	Capacitores grandes	De fluidos	Almacén		
Bélgica	6000 ^a	2500 ^a	-L	13000 ^a	500000 ^a			12100	Inst. Hig Epidem.
Dinamarca	15	500	250					524	Minis. Amb.
Francia	65000	8400	8400	50000/71000 ^b		110	500	113010	Minis. Industry.
Alemania	30000	20000	10000	50000/60000		1500 Fluido hidráulico		69500	Minist. Interior.
Grecia	67 ^c (32)	67 ^c (32)		63	6529		204	292	G. Chem. State. Lab.
Irlanda	23	25	-L	33	5000			78	Dep. Envir.
Italia	12000	3000						22200	Caffaro Spa. ^d
Luxemburgo	1191 ^e		-L				12 ^e	1906	Adm. Envir.
Países bajos	400	90	120	880 ^h	18000 ^h			730	Deleg. EEC.
España	22250	3490	-L					39090	Soc. Cross ^f
Inglaterra	3000	5000	4000	3000 ⁱ	10X10 ⁶			9800	Dep. Envir.
Total	139914 ^f	43037 ^f	22770 ^f	137000 Aprox.	1.53X10 ⁶ Aprox.			26923	

^a Datos estimados a partir del número de transformadores y capacitores grandes reportados como llenos de Askarel[®].

^b El Ministerio de Industria e Investigación reportó 50,000, la ANRED reportó 71,000.

^c El Ministerio de planeación y Medio Ambiente y la Corporación de Energía Pública reportó 68 Tm en transformadores; 65 ton en capacitores grandes y 54 Tm almacenados.

^d Montedippe ha estimado el total de 10,000 ton para transformadores y capacitores.

^e Basado en una inspección de transformadores de los cuales el 41.9% se encuentran en la industria acerera, el 25.6% en diferentes tipos de industrias y el 17.6% en edificios públicos o privados y solo un 14% en conexiones de instalaciones.

^f Total tomando las pie de notas en a y c.

^g El contenido de BPCs de transformadores multiplicada por 1.6 para obtener el total de fluido contaminado (Askarel[®]), por ejemplo BPC más solvente orgánico.

^h Información proporcionada por la Technisch Bureau der Bevoording Van Schadepreventie.

ⁱ Basado en 1 ton de BPC por transformador y 5 Kg por cada capacitor grande.

^j Número de pequeños estimados a 22,500,000 en los Países bajos y 80,000,000 en Inglaterra.

^k Basado en los datos proporcionados por la Sociedad Anónima Cross, interpretada por Bletchly (1984), la producción 1984/1985 no está disponible la Sociedad Cross estima que el 90% del total de la producción de BPCs ha sido utilizado en fluidos en transformadores y capacitores y que existen alrededor de 25,700 toneladas para futuras destrucciones.

^l La información de las cantidades de BPCs en pequeños capacitores es incompleta y es probable que existan más países que poseen BPCs almacenados que los que se muestran en la tabla.

Los BPCs son productos que fueron sintetizados para ser utilizados a gran escala en la industria. Dada sus excelentes propiedades físicoquímicas, se emplearon en diversas aplicaciones industriales. Debido a su lenta degradación y toxicidad, actualmente y de acuerdo con la legislación internacional, ha sido prohibido su uso y producción.

Curiosamente, fue precisamente por sus excelentes propiedades de uso industrial por las que han sido considerados uno de los contaminantes xenobióticos más difundidos en el ambiente y de más alto riesgo ya que sus características físicoquímicas, están estrechamente relacionadas con su grado de toxicidad y los mecanismos fisiológicos de eliminación en los organismos. Además, debido a su naturaleza lipofílica, poseen la tendencia de bioacumularse en el tejido adiposo de los diferentes grupos de organismos y por su baja capacidad para ser metabolizados.

Capítulo IV.

***MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN***

4. METODOS DE IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION

4.1 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

El procedimiento es similar al análisis de trazas de otras sustancias orgánicas lipofílicas por ejemplo plaguicidas halogenados.

El procedimiento analítico consiste en los siguientes pasos:

1. Muestreo
2. Extracción
3. Purificación
4. Separación, Identificación y Cuantificación.

En ciertos casos la concentración de la muestra involucra la extracción y la purificación que depende del tipo de muestra sometida al análisis, los rangos y niveles de BPCs en la muestra (Lang, 1992).

Los tipos de muestras pueden ser:

- a) Matrices gaseosas (aire)
- b) Agua y soluciones acuosas
- c) Matrices sólidas (suelo y sedimentos marinos y de estuarios)
- d) Matrices que contienen grasas (tejidos animales, sangre, leche, etc.)

4.1.1 MUESTREO

El propósito del muestreo es obtener especímenes que representen la situación que está siendo estudiada. Los planes de muestreo pueden requerir de muestreos sistemáticos obtenidos en tiempos y lugares específicos o bien, muestreos al azar que pueden ser válidos bajo ciertas especificaciones pero en cualquier caso, la muestra deberá ser estadísticamente representativa de la situación de interés (Keith, 1989).

Todos los aspectos del programa de muestreo deberán ser planeados y documentados en detalle y se deberá definir también el protocolo de los resultados y factores que intervienen durante el muestreo. El programa de muestreo debe incluir además las razones de elección del sitio de muestreo, el número y tipo de muestra, el período de toma de la muestra y el equipo de muestreo utilizado. El contenedor de almacenamiento no debe alterar en forma alguna, la composición cuantitativa y cualitativa de la muestra. En ciertos casos particulares, debido a que las muestras ambientales son típicamente heterogéneas es necesario realizar un buen número de muestreos (10 ó más) para obtener una composición significativa de los datos añadiendo además muestras de blanco para referencia (WHO/EURO, 1985, 1987 y 1988; Dobson y Van Esch, 1993).

De la calidad y utilidad de los datos analíticos especialmente de los rangos de microgramos-nanogramos o aun más bajos depende críticamente la validez de la muestra y la adecuación del programa de muestreo (Dobson y Van Esch, 1993).

La evaluación de muestras desde el punto de vista toxicológico, se debe realizar mediante un ensayo biológico que permita establecer la peligrosidad de las muestras a analizar. Si los ensayos son positivos, se deberán realizar los análisis químicos utilizando la cromatografía de gases/masas para determinar los isómeros tóxicos presentes en la muestra (Keith, 1990).

4.1.2 EXTRACCIÓN

En términos generales, la composición de los aceites minerales utilizados como dieléctricos, no es proporcionada por el proveedor sin embargo, la mayoría de los aceites residuales contienen mezclas complejas de hidrocarburos en grandes cantidades como por ejemplo: alquenos, isoalquenos, naftalenos y parafinas junto con residuos de azufre (comúnmente presentes en el aceite crudo) además de compuestos que tienen oxígeno que son los que llevan a cabo la oxidación del aceite durante su uso. Tales componentes interfieren en la determinación y tratamiento de los BPCs contenidos en el aceite, por lo cual es necesario realizar la extracción y/o purificación del BPC del aceite antes de cualquier análisis (DeVoogt, 1991).

El pretratamiento de los aceites dieléctricos residuales generalmente consiste en la disolución con un solvente adecuado, generalmente hexano o isooctano. El agua presente en la muestra debe ser eliminada con un tratamiento de sulfato de sodio anhidro seguida de un tratamiento de secado de la capa orgánica formada. Las partículas sólidas presentes en la muestra deberán ser separadas por filtración a través de un filtro de fibra de vidrio. Aunque la extracción líquido-líquido de la muestra no es un procedimiento común; el analito y las matrices pueden ser fácilmente eliminadas con acetonitrilo o dimetilformamida gracias a sus características polares utilizando silicagel para eliminar los remanentes del aceite (Devoogt, 1991).

Se han descrito hasta la actualidad, un gran número de procedimientos particulares con varias modificaciones, especialmente a los procedimientos de extracción y purificación. Existe además una gran cantidad de literatura especializada en el muestreo y método de extracción apropiado.

4.1.2.1 Muestreo de matrices gaseosas

Los instrumentos de muestreo para coleccionar y determinar BPCs en el aire consisten básicamente en algún material sorbente específico tales como los filtros de fibra de vidrio, espumas de poliuretano, Chromosorb, Silica gel, Tenax GC, resinas XDA-2 y capas de florasil que eliminan partículas hasta de 0.3 μm . Se utilizan también, redes de nylon de 200 μm cubiertas con aceite de silicona. Las partículas son capturadas del aire y filtradas por el sorbente, las cantidades de aire bombeado para ello, generalmente son de 100 a 1000 m^3 . Posteriormente los BPCs se extraen con varios solventes orgánicos, como hexano, diclorometano, benceno, tolueno y acetona o mezclas de ellos, mediante un extractor Soxhlet.

En estudios recientes, se ha empleado la extracción de fluidos supercríticos como método de separación. El límite de detección de partículas de BPCs en aire es de 0,3 ng/m^3 (Lang, 1992; Alford-Stevens et. al., 1985; Wittlinger y Ballschmiter, 1990; Brownlow y Que Hee, 1985; Chevreuil et. al., 1988 y 1989; Hawthorne et. al., 1989; Södergren, 1972; Rappe et. al., 1985;

WHO/EURO, 1987; NIOSH, 1977; Dobson y Van Esch, 1993; Bidleman, 1974; Swachamer, 1988; Larsson et. al, 1990; Nakano et. al., 1990; Diunker y Bouchertall, 1989).

4.1.2.2 Muestreo en agua

El muestro en agua, se realiza con dificultad por las bajas concentraciones de BPCs existentes en los ambientes acuáticos; sin embargo, suelen muestrearse de 1 a 100 L (Thome y Vandaele, 1987).

Los BPCs se extraen del agua haciendo pasar la muestra a través de un filtro con algún adsorbente sólido tales como undecano y monoesterato de Carbowax 400 soportado en Cromosorb W, o un soporte poroso como pulioretano, Tenax o resinas de Amberlita XAD-2, seguida por la elución de los BPCs con algún solvente orgánico.

Las muestras de agua también se extraen directamente con solventes orgánicos inmiscibles en agua, generalmente hexano o diclorometano. No obstante, las condiciones de extracción de la muestra en medios con pH ácido, pueden afectar los resultados de las estimaciones de concentración de BPCs en los sistemas acuosos.

El uso de solventes y membranas de diálisis, es un método eficaz para el muestreo de BPCs y otros contaminantes lipofílicos en ambientes acuáticos; en ellos, el muestreo y la extracción se realizan en un solo paso y su mayor ventaja es que la muestra obtenida no necesita purificarse (Ahlingen y Jensen, 1970; Harvey et. al., 1973; Anhof y Josepsson, 1974 y 1975; Dobson y Van Esch, 1993; Leoni et. al., 1976; Maguire Tkacz, 1989; Teichman et. al., 1978; Swackemer et. al., 1988; Diunker y Bouchertall, 1989; Gregor y Gummer, 1989; Schulz et. al., 1988; Morselli et. al., 1989; Hillebrand et. al, 1989; Chevreuil et. al., 1990; Södergren, 1990).

4.1.2.3 Muestreo de Suelos y Sedimentos

Las muestras de BPCs de los suelos y sedimentos, se extraen generalmente después de su homogeneización y secado con sulfato de sodio anhidro, lavado con hexano y posterior proceso de acondicionamiento de secado por 5 días a temperatura ambiente; la extracción se realiza con una mezcla de solventes orgánicos como acetona y diclorometano en un extractor Soxhlet; se utilizan también embudos de separación y baños ultrasónicos (Nakano et. al., 1990; Bidleman Onley, 1974, Teichman et. al., 1978; Edjulee et. al, 1985; Martin y Hartmon, 1985; Kominar et. al., 1985; Dunnivant Elzerman, 1988; Huckins et. al., 1988; Baker, 1989; Onuska et. al., 1983). Previo al análisis cromatográfico, se añade lana de cobre bañada con ácido nítrico al extracto de los sedimentos para remover el azufre elemental. Otros solventes que también se utilizan son: hexano, acetona o acetato de etilo aplicados individualmente o mezclados con alcohol isopropílico y diclorometano; las mezclas de diclorometano y acetato de etilo se aplican eficientemente para la extracción de BPCs de suelos contaminados en zonas industriales. Cuando las muestras de suelos y sedimentos contienen grasas o aceites, se extraen junto con los BPCs y se remueven en una segunda fase (Lang, 1992; Dobson y Van Esch, 1993). Se han utilizado también con eficacia, las técnicas de destilación con vapor y la extracción supercrítica.

4.1.2.4 Muestreo de Tejidos Animales

El muestreo de tejidos animales, se realiza por extracción después de la homogeneización y secado (con sulfato anhídrido de sodio) con solventes orgánicos como diclorometano, ciclohexano, etil acetato y benceno (Borlakoglu, 1989; Norstrom et. al., 1988; DiBella et. al., 1989; Shaw, 1984; Holt et. al., 1986; Focardi et. a al., 1986; Morse et. al., 1987; Olafsson y Bryan, 1987; Pellantová et. al., 1989). Las matrices que contienen grasas como la sangre y la leche se extraen primeramente con hexano (Zell y Ballschmiter, 1980; Petrick et. al., 1988); se aplican también otras mezclas de solventes como dietil éter en pequeñas cantidades de benceno; mezclas de benceno y acetona hexano y acetona, tolueno y acetato de etilo (Winger et. al., 1984; Maack y Sonzogni, 1988; Staling et. al., 1972; Fernández et. al., 1988; Schechter et. al., 1989; Mauck y Olson, 1977; Stalling et. al., 1979; Haines, 1983; Swachamer et. al., 1988; LeBel y Williams, 1986; Goerke y Weber, 1990).

Para su análisis en sangre, se utiliza frecuentemente la deshidratación con disolventes para facilitar la ruptura de las estructuras celulares, además de la saponificación, y en la leche además de esto, se utiliza la adsorción con sorbentes sólidos; para ello, primeramente, se mezcla la leche con fibra de celulosa y florisil o bien, con Lipidex 5000 como sorbente alternativo y antes de que se inicie el proceso de la evaporación del agua, la mezcla se extrae con hexano (Porter et. al., 1970; Norén y Westoo, 1986; Jensen y Jasson, 1976; Newsome y Shields, 1981; Tunistra et. al., 1980; Bush et. al., 1983; Mes y Marchand, 1987; Seymour et. al., 1987; Noren et. a l., 1978).

Generalmente se efectúa una fase previa de evaporación con rotavapor o Kuderna y un ligero flujo de nitrógeno para reducir la cantidad de extracto antes de la extracción e incrementar la concentración de BPCs antes de su determinación (Lang, 1992).

El límite de detección descrito por Reznicek (1987), con un método especial de extracción y determinación de BPCs en tejido sanguíneo es de 10 ppb.

4.2 PURIFICACIÓN

El objetivo de esta fase, es la separación de sustancias que podrían interferir en la determinación cromatográfica, por medio de la aplicación de diversos procedimientos para eliminar las impurezas que están presentes en las diferentes matrices (Dobson y Van Esch, 1993). La eliminación de interferencias puede realizarse por medio de procesos fisicoquímicos; para ello, se utilizan métodos como la cromatografía de adsorción sólido-líquido, la cromatografía de infiltración del gel y métodos químicos (Lang, 1992).

Los absorbentes y eluyentes más utilizados para la purificación de la muestra en la cromatografía de sólidos-líquido son:

- Se utiliza comúnmente el *florisil* eluido con hexano, o con mezclas de hexano y pequeñas cantidades de dietiléter o bencenos para la purificación de extractos en muestras de aire, papel, lodos residuales, suelos, sedimentos, tejidos animales y vegetales, leche y sangre (Alford-Stevens et. al., 1985; Bidleman y Onley, 1974; Denison y Vella, 1990; Martin y Hartman, 1985; Hansen et. al., 1981; Focardi et. al., 1986; Mauck y Olson, 1977; Mes et. al., 1989 y 1990; Shane y Bush, 1989; Lawrence y Tosine, 1977).
- *Silicagel*. Los BPCs pueden eluirse con hexano, mezclas benceno-hexano o hexano y diclorometano; en ocasiones, la silicagel suele impregnarse con ácido sulfúrico concentrado e

hidróxido de sodio utilizando en estos casos, hexano o pequeñas cantidades de benceno en hexano o ciclohexano como medios de extracción en muestras de agua, sedimentos, pigmentos, lana, madera, tejidos animales, aceites, sangre y suero después de un proceso de saponificación (Chen et. al., 1980; DiBella et. al., 1989; Needham, 1981; Operhuizen et. al., 1988; Chevreuli et. al., 1989; Huckin et. al., 1988; Gregor y Gummer, 1989; Sistovaris et. al., 1990; Hansen y Jurs, 1981; Jensen y Sundstron, 1974; Leoini et. al., 1976; Bidleman, 1974; Lang, 1992).

- Se ha utilizado la *Alúmina* eluida con hidrocarburos alifáticos ligeros (pentano, hexano, isooctano o con pequeñas cantidades de diclorometano en hexano) en la purificación de extractos en muestras de aire, sedimentos y tejidos animales, leche y sangre algunas veces después de la saponificación (Bidleman, 1974; Hansen y Jurs, 1981; Tunistra et. al., 1980; Newsome y Shields, 1981; Dunnivant y Elzerman, 1988; Mes et. al., 1989; Lang, 1992).
- *El carbón activado* ha sido un adsorbente especialmente utilizado para la purificación de BPCs en combinación con otros métodos de separación, es eficaz para la separación de BPCs de estructura coplanar; en este proceso, los BPCs pueden ser eluidos utilizando varios solventes orgánicos y/o mezclas de ellos (hexano, diclorometano, etilacetato, benceno y tolueno). Este método ha sido frecuentemente utilizado en la separación de BPCs de acuerdo su a toxicidad conferida por la planaridad de su estructura (Teichman et. al., 1978; Huckins et. al., 1988; Mes et. al., 1990; Tanabe et. al., 1987; Gagnon, 1990; Jensen y Sundstron, 1974; Stalling et. al., 1975; Smith et. al., 1990; Hong y Bush, 1990).
- Algunas veces es necesario utilizar dos absorbentes en combinación para purificar un extracto; generalmente se aplica una mezcla *de sílica y alúmina* para purificar extractos de aire, agua, sedimentos, aceites vegetales y tejidos animales (Nakano et. al., 1990; Morselli et. al., 1989; Swackhamer et. al., 1988; Chen, 1981). Las mezclas de *florisil-silicagel*, se utilizan para extractos de sedimentos y tejidos animales (Kannan et. al., 1988; Lognathan et. al., 1989; Luke et. al., 1989). Para la purificación de extractos de peces, se utilizan combinaciones de *alúmina-florisil*, además de combinaciones de *alúmina-silicagel* (Zell y Ballschmiter, 1980).
- Otra técnica de purificación utilizada es la *cromatografía de infiltración de gel (GPC)* que se utiliza para separar la grasa de los extractos. Los geles más comúnmente utilizados son: el BioBeads S-X3, el X-4, el X-12, el Sphadex LH y PLRP-S (Maack y Sonzogni, 1988; Stalling et. al., 1979, 1972, 1975 y 1985; Haines, 1983; Tunistra et. al., 1990; Sericano et. al., 1990; Seymour et. al., 1987).

Para la eliminación de sustancias interferentes como las grasas, se han utilizado solventes como hexano y acetonitrilo o dimetilformamida, ó bien se tratan con un ácido fuerte como el ácido sulfúrico fumante; o en su defecto, es conveniente realizar una digestión alcalina de la muestra (saponificación) antes de la extracción.

Cuando se analizan suelos o sedimentos, es necesario realizar la eliminación de azufre con reactivos TBA-sulfito (extractado en hexano, tetrabutil amonio y sulfato anhidro saturado con sulfito de sodio). Se han desarrollado y optimizado también, una serie de métodos y procedimientos de *purificación* de la leche por adsorción en un disolvente polar antes de ser extraído en un aparato Soxhlet y utilizando también una columna de polímeros (HPLC) para la purificación del extracto (Seymour et. al., 1986b y 1987).

La técnica de purificación *con cromatografía de adsorción sólido-líquido (LSC)* es también eficiente con algunas modificaciones. La técnica de *Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)* por sus siglas en inglés) utilizando una fase estacionaria especial y hexano como fase móvil, es muy útil para la pre-separación de BPCs de acuerdo a su estructura coplanar (la separación utilizando esta columna, es muy similar a la obtenida cuando se emplea carbón activado). La ventaja de esta técnica, es su mayor eficiencia de separación de los picos con buena simetría, permitiendo así, una buena separación de los isómeros mono-orto coplanares utilizando un único solvente en pequeñas fracciones de volumen (2 a 3 ml) en comparación al carbón activado el cual requiere de cientos de mililitros.

Se ha utilizado también, la cromatografía de HPLC de fase estacionaria y una mezcla de diclorometano-pentano como fase móvil acoplado en línea con la cromatografía de gases con detector de masas (CG/MS por sus siglas en inglés) utilizando monitores de iones selectivos que detectan solo BPCs aún en presencia de plaguicidas clorados (Seymour et. al., 1986c). Sin embargo, es necesario realizar otro método de modificación adicional cuando existen grasas o azufre en la matriz a analizar (Lang, 1992).

Es difícil precisar las ventajas de una determinada técnica de purificación; sin embargo esto puede hacerse aplicando la técnica más adecuada al caso particular de acuerdo a las características específicas de la matriz en estudio. La cromatografía de adsorción sólido-líquido es muy eficiente y puede modificarse de acuerdo al caso específico sin embargo, un problema muy serio puede ser la reproducibilidad de los resultados por lo cual, es necesario estandarizar el método y se debe además, tener el mayor cuidado en la elección de la capacidad del adsorbente respecto a la cantidad de la muestra ya que, mientras mayor es la carga de lípidos en la columna, menores son los volúmenes de elución de los compuestos a separar.

Por otra parte, los mismos adsorbentes fabricados por diferentes productores, o aún de la misma compañía pero de diferentes lotes de producción, pueden presentar propiedades diferentes, lo cual se traduce en problemas en la reproducibilidad de los resultados del análisis (Lang, 1992).

4.3 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Es muy frecuente que la precisión en la determinación de los niveles de BPCs sea muy variable y dependiente de la matriz y otros factores tales como su baja solubilidad en agua y biodegradabilidad de los isómeros individuales los que cuando se encuentran presentes, pueden alterar la composición de la muestra (Dobson y Van Esch, 1993).

Existen varios métodos indirectos para la determinación de BPCs, entre los que destaca el método a partir del cloro orgánico total en aceites de transformadores. Sin embargo, el *método de cromatografía de gases (CG)* es el más eficazmente utilizado por su alto grado de selección en un complejo de mezclas empleando columnas capilares de sílice con varias fases estacionarias; de acuerdo con Dobson y Van Esch (1993), sus principales ventajas sobre otras técnicas, son su tipo de detector altamente sensitivo, su alta eficiencia de separación y la posibilidad de acoplarlo a otros métodos de identificación de compuestos como la espectroscopía de masas (MS por sus siglas en inglés) con buena reproducibilidad en los resultados del análisis (Lang, 1992).

Cada proceso cromatográfico incluye

- La inyección de la muestra
- Separación
- Detección

4.3.1. Inyección

La inyección no es problema cuando se utilizan columnas empacadas. Cuando se utilizan columnas capilares es necesario utilizar inyectoros "splitless" o la inyección directa "en columna" (Lang, 1992). La inyección con splitless puede causar una alteración significativa en el análisis, debido al amplio rango de los puntos de ebullición de las mezclas de BPCs, unido a la introducción de impurezas que pueden incrementar aún más esta respuesta. Por otro lado, aunque la inyección directa "en columna" da mejores resultados, es mucho más sensible a la presencia de impurezas que la inyección en splitless lo que se traduce en errores en la fase de cuantificación (Onuska et. al., 1983).

4.3.2. Separación

En el proceso de separación, generalmente se emplean columnas empacadas o columnas capilares con fases estacionarias "no polares" o débilmente polares. El propósito de aplicación de tales fases en la identificación de los isómeros tóxicos, es la introducción de otro tipo de mecanismo de separación y también, otro tipo de orden de elución para mejorar y facilitar su separación. Ciertas fases estacionarias tales como las fases de *n*-octil-(50%)-metilpolisiloxano y SB octil 50, facilitan especialmente la determinación de tales isómeros, debido a sus características de retención y orden de elución que depende considerablemente, de la geometría de las moléculas (grado de coplanaridad), pero se debe tener en cuenta que tales fases son altamente sensibles a inestabilidades térmicas y químicas.

Cuando se utilizan columnas empacadas para analizar mezclas de BPCs, el cromatograma muestra solo algunos picos que representan generalmente varios isómeros. En general, las columnas capilares han reemplazado a las columnas empacadas debido a la alta resolución con lo que las mezclas se separan en muchos más componentes que cuando se utilizan columnas empacadas, sin embargo, una sola columna capilar no es capaz de separar todos los 209 isómeros de BPCs y requiere de estándares individuales con rangos de temperatura de columna entre los 170 °C y 230 °C (Lang, 1992; Dobson y Van Esch, 1993). La separación completa de las mezclas de BPCs se logra con la cromatografía de gases utilizando dos columnas capilares con diferentes fases estacionarias (Lang, 1992; Diunker y Bouchertall, 1989).

Generalmente se emplean columnas capilares de 25 a 60 metros de longitud con diámetro interno (d.i.) de 0,2 a 0,32 mm. La elución de los distintos compuestos de la muestra se realiza a través de un programa de temperatura y en la cuantificación se emplean patrones secundarios o bien isómeros individuales. Los isómeros 28, 52, 101, 138, 153 y 180, son los más determinados porque cubren un amplio rango de números de cloro y la mayoría de ellos se encuentran presentes en gran cantidad de muestras comerciales.

Por otra parte, las modificaciones de optimización realizadas a los programas de temperatura en los métodos secuenciales simples de cromatografía de gases utilizando columnas capilares, ha

mejorado la separación de ciertos isómeros de BPCs difícilmente detectables en las mezclas comerciales de Aroclors® (Jiménez et. al., 1992).

4.3.3. Detección

El Detector de Captura de Electrones (ECD por sus siglas en inglés) es el sistema de detección más frecuentemente utilizado en la cromatografía de gases para BPCs debido a su extrema sensibilidad, pero por otro lado es sumamente vulnerable a las impurezas y sobrecarga. La respuesta del ECD es variable de un detector a otro; depende además, de ciertas condiciones particulares tales como las variaciones de temperatura, la calidad del gas que pasa a través de él, la velocidad y flujo del gas y la limpieza del detector (Lang, 1992).

El principio básico del funcionamiento del ECD, se inicia cuando los componentes electronegativos de la muestra, absorben o capturan electrones al pasar a través del detector produciendo una disminución proporcional en el registro de la corriente eléctrica de base, el cual es registrado con un determinado tiempo de retención en el cromatograma que es específico para un determinado componente de la muestra. La identificación de los tiempos de retención de un compuesto específico, se determina por comparación con los tiempos de retención del análisis de estándares, en las mismas condiciones en que se analiza la muestra.

Es importante tener en cuenta que a pesar de su selectividad, muchos compuestos no halogenados como las sustancias con grasas, ésteres de ftalato y azufre elemental, entre otros, pueden interferir en la detección por lo cual es necesario realizar el proceso de purificación del extracto previo al análisis cromatográfico (Morselli et. al., 1989).

Un segundo sistema de detección frecuentemente utilizado es la Espectrometría de Masas. Este sistema, proporciona información de la estructura y masa molecular de las sustancias analizadas, obteniéndose así, una identificación precisa de los componentes a analizar de la muestra.

La espectrometría de masas es muy útil cuando las muestras contienen grandes cantidades de compuestos organoclorados y la detección de BPCs dentro de ellos se puede llevar a cabo de dos formas:

- La ionización de impacto electrónico (IIE)
- La ionización química con detección de ion negativo (IQINI).

Los mecanismos de respuesta de ambos son en algunos aspectos similares a los del ECD, (Lang, 1992) sin embargo, la mayor desventaja de esta técnica es la detección mínima relativamente alta, que es del orden de dos o tres veces superior al del ECD (Pellizari et. al., 1981) para mejorar esta detección, se realiza un monitoreo selectivo de iones (MSI), seleccionados de acuerdo al rango de masas de interés.

Para la identificación de los iones, se selecciona cada grupo de isómeros y se monitorean las masas de estos iones; en la tabla IV-1 y Figura IV-1 se presentan el programa de masas para los BPCs de acuerdo a cada grupo de isómeros.

Tabla No. IV-1.- Programa de detección de masas (Dobson y Van Esch, 1993)

<i>BPCs</i>	<i>Rango de masas monitorizado</i>	<i>Iones para la identificación</i>	<i>Iones para la cuantificación</i>
Monocloro-	186 - 190	188, 190	188, 190
Dicloro -	220 - 226	222, 224, 226	222, 224
Tricloro -	254 - 260	256, 258, 260	258
Tetracloro -	288 - 294	290, 292, 294	292, 294
Pentacloro -	322 - 328	324, 326, 328	326, 328
Hexacloro -	356 - 364	358, 360, 362	360, 364
Heptacloro -	386 - 400	394, 396, 398	394, 398
Octacloro -	426 - 434	428, 430, 432	430, 432
Nonacloro -	460 - 468	462, 464, 466, 468	464, 468
Decacloro -	494 - 504	496, 498, 500, 502	498

Se han desarrollado también otras técnicas de detección como el Detector de Descarga de Helio para determinar BPCs en ciertas muestras; la respuesta de este detector esta dada por la detección específica de emisión de cloro, basado en el número de átomos de cloro presentes. Sin embargo, sus altos límites de detección (10 a 35 pg) limitan su aplicación.

Otra técnica de detección utilizada, es el Detector de Ionización de llama (FID por sus siglas en inglés) pero no es específico, y posee también un alto límite de detección mínima para ser utilizado en la determinación trazas de BPCs en muestras ambientales; sin embargo, se utiliza para la determinación de la composición de compuestos comerciales de BPCs.

La espectrometría infrarroja de transformadas de Fourier (FT-IR por sus siglas en inglés) es otra técnica de detección disponible para cromatografía de gases que provee como la espectrometría de masas, otro tipo de información de los datos (espectro infrarrojo) intrínsecos a un compuesto particular, incluso de cada isómero de BPC lo cual facilita la resolución en la ambigüedad de identificación de isómeros con la ayuda de estándares externos. Los resultados obtenidos de varios estudios indican que cada uno de los isómeros de los BPCs posee un espectro infrarrojo propio. La desventaja de esta técnica, es su alto límite de detección (1 a 10 pg) (Schneider et. al, 1985) y su alto costo de instrumentación (Lang, 1992; Herres, 1987).

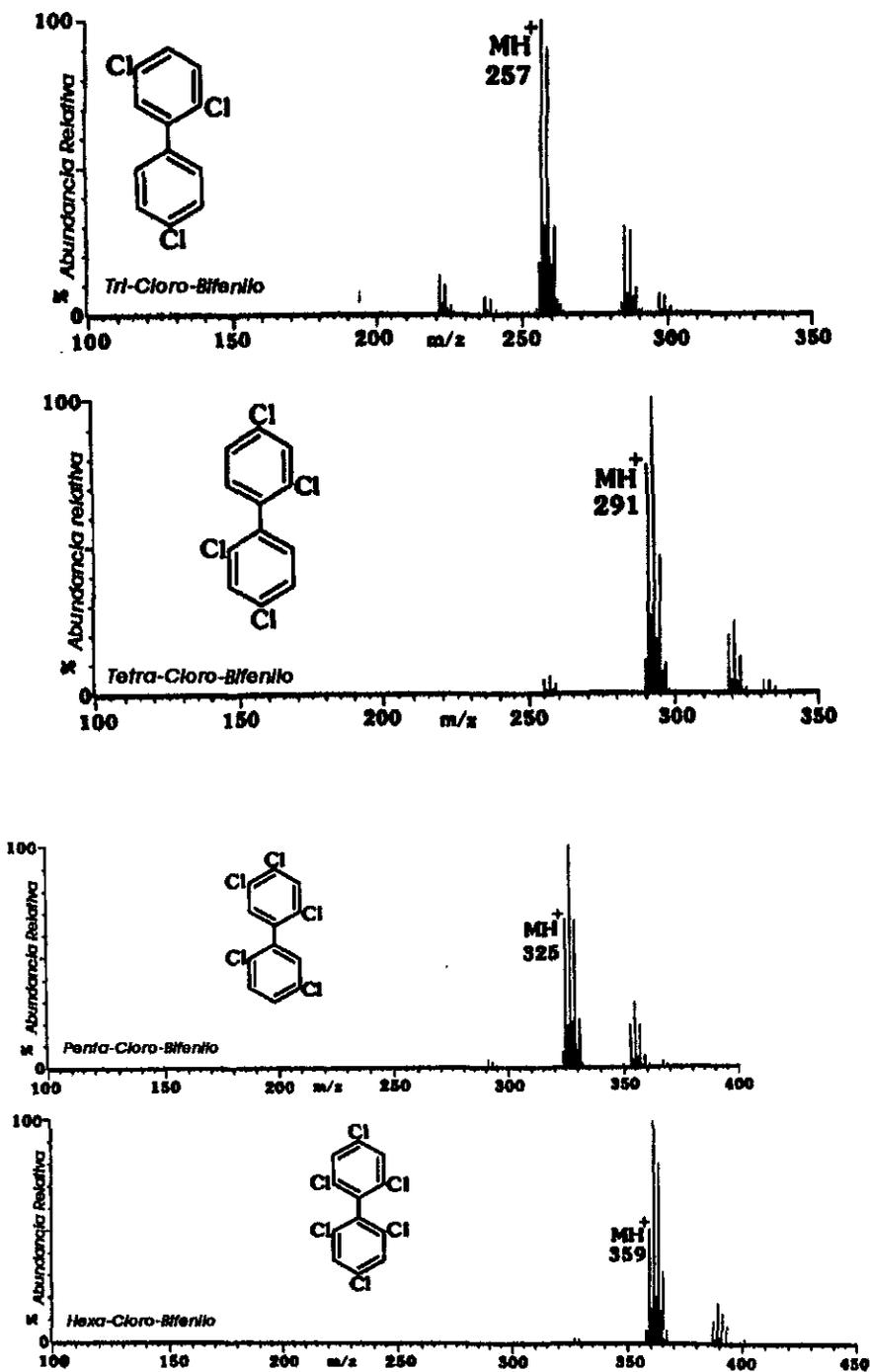


Fig. No.IV-1.- Espectro de masas con Ionización Química (CI/MS) de varios isómeros de BPCs (Dobson y Van Esch, 1993).

4.4. CUANTIFICACIÓN

La elección de los métodos analíticos para identificar y cuantificar los BPCs depende del propósito en particular y de los objetivos que se desean alcanzar.

El método de cuantificación más frecuentemente utilizado en la determinación de los bifenilos policlorados es la cromatografía de gases utilizando columnas capilares con detectores de captura de electrones o acoplado a espectrómetro de masas, Figuras IV-2, IV-3 y IV-4. Este método, se utiliza tanto en soluciones patrón, como para las mezclas más difíciles; sin embargo se requiere de procesos de depuración cuando existen mezclas complejas, y para ello, se utilizan técnicas especiales, tales como la separación preliminar por columnas cromatográficas (Alford-Stevens et.al., 1986^a, 1986b y 1986c; Analisis; Baker,1991; Bellar, 1989; Bush y Lo, 1973; Coburn et. al., 1977; Cooper et. al., 1985; Diunker y Bouchertall, 1989; Hambree et. al., 1993).

Cuando las muestras a analizar contienen plaguicidas organoclorados o grasas, estos se separan y remueven fácilmente de la matriz por cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando adsorbentes como la silicagel, alúmina o florisil como fase estacionaria antes de realizar la determinación de los BPCs por cromatografía de gases-masas (Dobson y Van Esch, 1993; Mulher et. al., 1971; Holden y Marsden, 1969; Amour y Burke, 1970; Collins et. al., 1972).

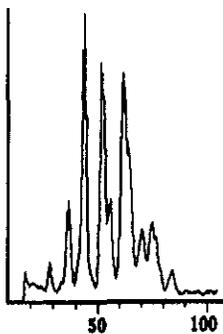
La determinación rigurosa de todos los isómeros de BPCs en una muestra, requiere su completa separación, con aplicación de estándares puros de todos los isómeros lo que eleva el costo de la determinación esto, unido a que se requiere de mucho tiempo, por lo que se ha reducido su aplicación. No obstante, frecuentemente se utiliza una única columna capilar para separar 187 isómeros de BPCs, alcanzando su máxima resolución, con tiempos de análisis que van de 140 a 200 minutos (Mullin y Pochini, 1984).

Cuando se utilizan columnas capilares, se logra mayor resolución y separación de los componentes de las mezclas que cuando se utilizan las columnas empacadas; sin embargo, aunque una sola columna capilar no es capaz de separar los 209 isómeros de BPCs, se puede alcanzar una separación completa empleando dos columnas capilares con diferentes fases estacionarias. Estos sistemas secuenciales permiten que las partes de la muestra que no se han resuelto en la primera columna, se transfieran a la otra columna, en donde se puede completar su separación.

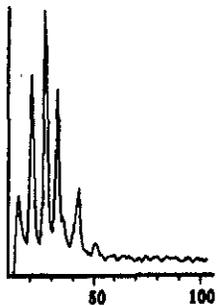
La cuantificación se realiza utilizando estándares secundarios en vez de isómeros individuales que son a menudo, mezclas de BPCs comerciales de composición conocida. La ayuda de un sistema de cómputo es muy útil cuando se emplean los tiempos de retención para la identificación de los distintos picos Tabla IV-2.

Para la determinación de sólo unos cuantos picos de isómeros seleccionados, se utilizan isómeros individuales como estándares de referencia obteniéndose así, una identificación y cuantificación precisa.

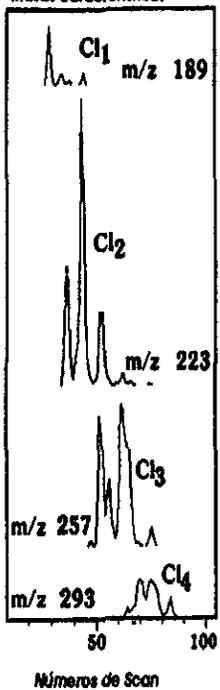
AROCLOR 1016



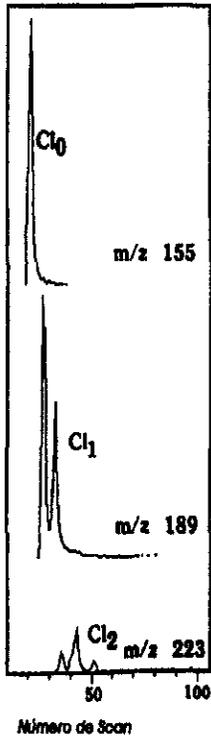
AROCLOR 1221



Masas características



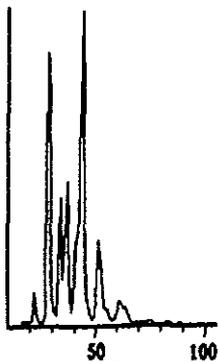
Masas Características



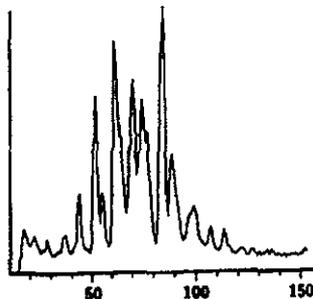
o lo

Figura No. IV-2.- Iones característicos del programa de monitoreo de masas de los Aroclors[®] 1012 y 1221 (Dobson y Van Esch, 1993).

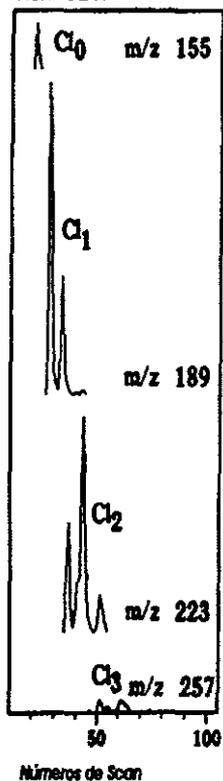
AROCLOR 1232



AROCLOR 1248



Masas Características



Masas características

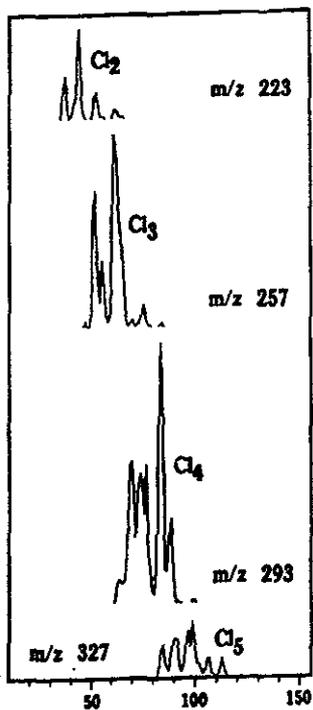


Fig. No.IV-3.- Iones característicos del programa de monitoreo de masas de los Aroclors[®] 1232 y 1242 (Dobson y Van Esch, 1993).

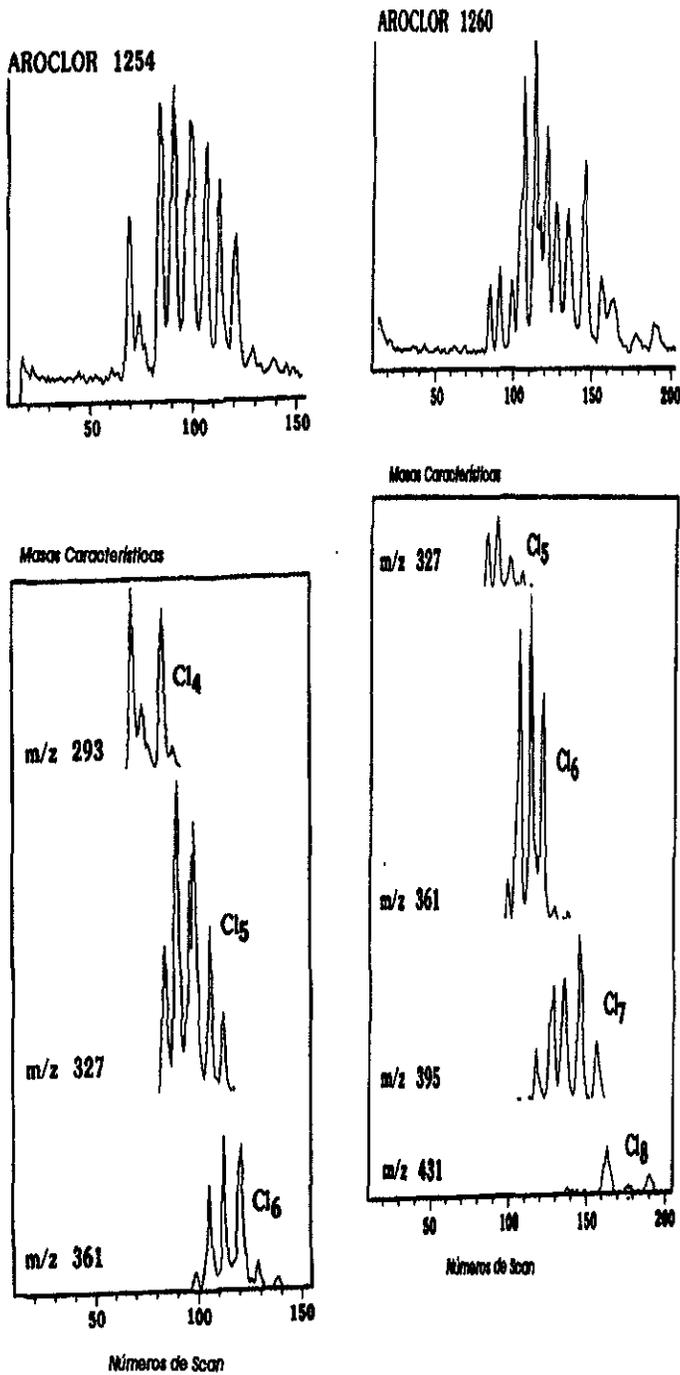


Fig. No. IV-4.- Iones característicos del programa de monitoreo de masas de los Aroclors® 1254 y 1260 (Dobson y Van Esch, 1993).

La cuantificación puede llevarse a cabo de dos maneras, ya sea determinando los isómeros que generalmente se encuentran presentes a altas concentraciones y calculando sus cantidades respecto a la cantidad total de BPCs o bien, determinando los isómeros más importantes desde el punto de vista toxicológico.

La cuantificación empleando cromatografía de gases con columnas empacadas se realiza por la introducción del método de índice de retención de la muestra.

Tabla IV-2.- Tiempos de retención de Aroclors en sistemas duales con columnas capilares DB-5/DB-7101 (Dobson y Van Esch, 1993).

Número de pico	Aroclor 1016	Aroclor 1221	Aroclor 1237	Aroclor 1247	Aroclor 1248	Aroclor 1254	Aroclor 1260
1		5.85	5.85				
2		7.63	7.64	7.57			
3	8.41	8.43	8.43	8.37			
4	8.77	8.77	8.78	8.73			
5	8.98	8.99	9.00	8.94	8.95		
6	9.71			9.66			
7	10.49	10.50	10.50	10.44	10.45		
8	10.58	10.59	10.59	10.53			
9	10.90		10.91	10.86	10.85		
10	11.23	11.24	11.24	11.18	11.18		
11	11.88		11.90	11.84	11.85		
12	11.99		12.00	11.95			
13	12.27	12.29	12.29	12.24	12.24		
14	12.66	12.68	12.69	12.64	12.64		
15	12.98	12.99	13.00	12.95	12.95		
16	13.18		13.19	13.14	13.15		
17	13.61		13.63	13.58	13.58	13.59	13.59
18	13.80		13.82	13.77	13.77	13.78	
19	13.96		13.97	13.93	13.96	13.90	
20	14.48		14.50	14.46	14.45	14.16	
21	14.63		14.64	14.60	14.60		
22	14.99		15.02	14.98	14.97	14.98	
23	15.35		15.36	15.32	15.31	15.32	
24	16.61			15.96			
25			16.14	16.08	16.08	16.10	
26	16.27		16.29	16.26	16.24	16.25	16.26
27						16.53	
28			17.04		16.99	16.96	16.97
29			17.22	17.19	17.19	17.19	17.21
30			17.46	17.43	17.43	17.44	
31					17.69	17.69	
32				17.92	17.91	17.91	
33				18.16	18.14	18.14	
34			18.41	18.37	18.36	18.36	18.37
35			18.58	18.56	18.55	18.55	
36							18.68
37			18.83	18.80	18.78	18.78	18.79

38			19.33	19.30	19.29	19.29	18.29
39						19.48	18.48
40						19.81	19.80
41			20.03	19.97	19.92	19.92	
42						20.28	20.28
43				20.46	20.45		
44						20.57	20.57
45				20.85	20.83	20.83	20.83
46			21.18	21.14	21.12	20.98	
47					21.36	21.38	21.38
48						21.78	21.78
49				22.08	22.05	22.04	22.03
50						22.38	22.37
51						22.74	22.73
52						22.96	22.95
53						23.23	23.23
54							23.42
55						23.75	23.73

Existen además otros métodos para determinar BPCs que no se utilizan frecuentemente pero que pueden ser de gran utilidad, si no se requiere una precisión minuciosa en los resultados entre los que destacan: (Dobson y Van Esch, 1993)

- *El método de selección de picos o método de comparación de picos*; para ello, se eligen ciertos picos como representantes de la mezcla empleando estándares comerciales (Aroclors®) como referencias de comparación de las áreas o alturas de los picos seleccionados en el cromatograma.
- *Método de comparación de la respuesta de todos los picos en la muestra con aquellos del estándar de referencia.*
- *El método Webb McCall* consiste en realizar el análisis cromatográfico de la muestra, bajo las mismas condiciones que el estándar utilizando un detector de conductividad de Coulson, de captura de electrones y espectrómetro de masas. De los resultados obtenidos se determina el porcentaje en peso de cada uno de los picos de la muestra y se compara con los resultados de las tablas de los Aroclor® 1221, 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260, preparadas por Webb y McCall; para la cuantificación de las muestras, se emplean los factores de respuesta de los estándares calculados para otros detectores de captura de electrones. Este método ofrece mejores resultados que el método anterior pero es necesario utilizar las mismas condiciones cromatográficas y los mismos estándares empleados por Webb y McCall (Lang, 1992) ahora bien, el Factor de Respuesta Relativo (FRR) de los diferentes isómeros depende del número de átomos de cloro y su posición en la molécula y para su fácil manejo, han sido minimizados agrupando a los congéneres en 31 grupos de acuerdo al FRR de los estándares comerciales sin embargo, cuando la identificación de algunos picos no puede ser determinada sin ambigüedad, éstas se resuelven por la aplicación de otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas o infrarroja (Dobson y Van Esch, 1993).

- *El método de percloración*, es la conversión de todos los isómeros de los BPCs en decacloro bifenilos mediante purificación utilizando un agente catalizador de cloración, generalmente pentacloruro de antimonio y determinando el decacloro bifenilo formado. El método representa una cuantificación real desde el punto de vista cromatográfico ya que los compuestos determinados y los estándares se definen como compuestos individuales. La desventaja de este método, es que proporciona poca información de la composición de los isómeros en la muestra y su aplicación, puede verse afectada por cambios en las condiciones de la reacción, tales como la temperatura además de la introducción de otros compuestos que pueden convertirse en decacloro bifenilos e inducir a errores de lectura.
- *El método de decloración*, involucra la conversión de todos los isómeros de los BPCs a bifenilo. El agente reductor puede ser hidrógeno en presencia de paladio como catalizador o una solución de hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) en dietileter. La determinación se realiza con cromatografía de gases y detector de ionización de llama (FID); se sugiere también el uso de cromatografía de líquidos con detección UV para determinar tanto el decaclorobifenilo como el bifenilo ya que los bifenilos polibromados pueden interferir en la determinación (Kock et. al., 1981).

El segundo sistema de cuantificación más frecuentemente utilizado es la espectrometría de masas con detector múltiple de iones (DMI). El límite de detección utilizando espectrometría de masas de alta resolución es de 0.01-1 pg. para cada uno de los isómeros inyectados. No obstante, los niveles de detección en la muestra dependen del tamaño de la muestra y de la matriz que lo contenga, por ejemplo, en una muestra de aire ambiental, el nivel de detección es de 0.05 pg/m^3 por isómero. En general se considera que no existe interferencia de otras sustancias en niveles cercanos a 0.01 mg/kg . En aguas de río y aire los límites de detección de BPCs pueden ser de 1 ppt y 0.3 ng/m^3 respectivamente (Dobson y Van Esch, 1993; Rappe et. al., 1985; WHO/EURO, 1987).

Se ha empleado también el método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detectores UV para determinar y cuantificar mezclas comerciales de BPCs; y para ello, se utilizan columnas empacadas de 5 μm de *LiCrosorb Si 60* como fase estacionaria y *n*-hexano como fase móvil, en el análisis de bifenilos decaclorados (después de la percloración de los BPCs) o bifenilos (después de la decloración). Su gran desventaja es el alto límite de detección (0.5 ng para el bifenilo) sin embargo, es utilizado muy eficazmente para la purificación y separación de los extractos antes del análisis de Cromatografía de gases (Lang, 1992).

Existen técnicas que combinan los métodos de espectroscopía de masas y la espectroscopía infrarroja, para analizar cuantitativa y cualitativamente, mezclas de BPCs e incluso los isómeros posicionales; la clave principal de este aparato es el dispositivo especial para temperatura de 77°K del efluente al cromatógrafo de gases. Esta técnica produce espectros infrarrojos semejantes a la fase espectro de condensación de temperatura ambiente normal, en comparación a la fase de espectro de gas producida por la cromatografía de gases convencional; la porción de cuantificación de masas del instrumento, tiene capacidad cuantitativa superior con límites de detección inferiores al nanogramo utilizando iones de monitoreo selectivo, la técnica ha demostrado ser efectiva con límites de detección muy bajos, hasta de 500 pg. para el 3,3',4,5-tetraclorobifenilo (Durell y Sawyer, 1990).

Los métodos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución y la Espectrometría Infrarroja aunque son aplicables bajo ciertos límites, son útiles para la separación de compuestos en la mezcla (Dobson y Van Esch, 1993; Hasan y Jurs, 1990; Huckins et. al., 1988; Jakus y Baskunov, 1991^a y 1991b; Karasek et. al., 1981; Lawrence y Tosine, 1976; Leoini et. al., 1976; Robbat, 1988; Slade, 1976; Sofer, 1986; Voyksner et. al., 1986; Webb y McCall, 1973; Winfield, 1989a; Winfield, 1989b).

La cuantificación de isómeros individuales puede realizarse también, utilizando la cromatografía de gases y líquidos con columnas capilares de vidrio, con detectores de ionización de flama de hidrógeno y captura de electrones (Albro et. al., 1981; Duinker y Hillebrand, 1983). Aunque para ello, en ocasiones, es necesario utilizar referencias de las características cualitativas y cuantitativas de los estándares de BPCs estudiados en la literatura existente que son necesarias para la calibración de los procesos analíticos, como la determinación de los tiempos de retención y los factores de respuesta comparados con espectros de análisis cromatográficos y espectroscópicos previamente realizados. Además, cuando sea posible se deberá utilizar el marcaje de isótopos (C^{13} y Cl^{37}) dentro de la muestra para incrementar la precisión en el análisis dando validez al muestreo, al proceso de purificación de la muestra y a la cuantificación.

El cromatógrafo de gases con captura de electrones acoplado a espectrometría de masas es el método más utilizado para la identificación del ^{13}C marcado en los BPCs y constituye la mejor técnica disponible de aplicación universal a productos y residuos comerciales (Dobson y Van Esch, 1993).

4.5. OTROS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE BPCs

4.5.1. **El Radio Inmuno Ensayo (RIA por sus siglas en inglés)** basado en la competencia entre un compuesto (que actúa como ligando) y un radio-ligando para la unión a sitios en el antisuero, el cual es una sustancia especialmente preparada con el propósito de emplear las respuestas del sistema inmunitario de los animales, especialmente en conejos. La preparación de la muestra incluye un proceso de extracción y purificación en el cual, el solvente es evaporado hasta sequedad y el extracto es disuelto en dimetilsulfóxido al que se añaden cantidades conocidas de antisuero y radioligando y después de la incubación, los ligandos unidos o no, son separados, se determinan las cantidades de los radioligandos no unidos midiendo su reactividad y se calcula la cantidad de ligandos en la muestra. La afinidad de los BPCs al antisuero es selectiva pero no específica, lo cual reduce la aplicación del método en la determinación de análisis de isómeros específicos, sin embargo, los resultados, expresados como total de BPCs son comparables a los obtenidos utilizando cromatografía de gases con columnas empacadas (Lang, 1992; Dobson y Van Esch, 1993).

4.5.2. **Bioensayos mediante células de hepatoma de ratas H-4-II E.** Algunos isómeros de BPCs son inductores significativos de un determinado sistema enzimático (AHH-anhidro carburo hidrolasas, EROD-etoxiresorufina-o-dietilasa) en células animales, y puede correlacionarse la potencia inductora de un isómero *in vitro* con la potencia para causar efectos tóxicos en organismos vivos. Es posible utilizar un cultivo de células para ensayos del receptor *Ah* relacionado con el potencial tóxico de los compuestos en extractos de muestras ambientales. Básicamente, el método consiste en la disolución del extracto de la muestra a analizar en dimetilsulfóxido o isooctano el cual se adiciona a las células cultivadas en *cajas petri* y

después de un período de incubación de 72 hrs. se analiza y determina la velocidad de conversión de las células, de benzo(a)pireno a 3-hidroxibenzo(a)pireno (actividad AHH) y/o la velocidad de conversión de etoxiresorufina (actividad EROD) de espectro fluorimétrico. Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos empleando estándares de 2,3,7,8-TCDD a concentraciones conocidas y los resultados finales, se expresan como toxicidad equivalente al 2,3,7,8-TCDD. El límite de detección es de 10 pg de equivalente del 2,3,7,8-TCDD. Este método constituye una herramienta eficiente para los estudios de monitoreo ambiental (Safe et.al., 1987; Tillitt et. al., 1991^a y b; Nebert y Gilborn, 1986; Lang, 1992; Dobson y Van Esch, 1995).

- 4.5.3** *El ensayo competitivo de unión para ligandos del receptor Ah.* El método permite determinar la afinidad de unión de los componentes de una muestra al receptor *Ah*, el ensayo se basa en la competencia entre el radioligando (2-[125 I] yodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxina) y los componentes de la muestra para unirse al receptor *Ah* preparado a partir de hígado de mono. La mínima concentración detectable es 0,8 pg de 2,3,7,8-TCDD en 0,25 ml. Este método es también utilizado en análisis ambientales (Bradfield et. al., 1988a; Bradfield y Poland, 1988b).
- 4.5.4.** *Las propiedades del espectro de UV* de los BPCs son utilizadas además de los análisis de cromatografía de líquidos con detector UV en la identificación de productos sintéticos (Hutzinger et. al., 1974) congéneres individuales (IARC,1978; Appleby, 1976) y mezclas de Aroclors (Brinkman et. al.,1976). Se ha reportado también, la aplicación del espectro de la excitación fosfofluorescente de congéneres de BPC en ciclodextrina.
- 4.5.5.** *La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*, proporciona información sobre: la estructura de un compuesto orgánico, los tipos de protones equivalentes en el compuesto, el número relativo de protones que producen absorción y el número de hidrógenos en los átomos de carbono adyacentes. Sin embargo, no siempre es posible identificar la estructura de un compuesto sólo por su espectro de RMN pero cuando se combina con datos de la espectroscopía infrarroja (IR) o espectroscopía de masas (MS), es posible determinar con precisión la estructura de ciertos congéneres de BPCs. Los trabajos de Mullin y Pochini (1981 y 1984), han publicado la determinación de todos los congéneres de BPC por RMN utilizando el marcaje de isótopos ¹³C. Hutzinger et. al. (1974) ha presentado datos sobre 17 congéneres componentes del Aroclor[®] 1254. En la misma línea de trabajo, Wilson (1973) ha presentado el espectro RMN de ¹³C y ¹H de 10 congéneres simétricos de BPCs, caracterizando por ¹H el espectro de los congéneres tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa- y nonaclorobifenilos.

Además de los métodos descritos, existen otras técnicas que se emplean en casos muy específicos tales como: la determinación de cloro en aceites de transformadores utilizando la activación neutrónica y espectrometría de rayos γ . También, se ha utilizado el método de conversión de cloros de la molécula de BPCs en iones cloruro con sodio metálico (Finch, 1990) y su determinación con espectrofotometría o mediante un electrodo selectivo para iones cloruro, todos estos métodos están limitados a muy altas concentraciones de BPCs en la muestra y no proveen información cualitativa de las muestras; sin embargo, su principal ventaja es su simplicidad (Lang, 1992).

4.6. MEDICIONES EN CAMPO

Además de los métodos de laboratorio descritos anteriormente, se han desarrollado infinidad de pruebas campo fáciles de utilizar por su simplicidad. Las mediciones de concentración de los BPCs originadas por fugas o derrames del aceite mineral de los transformadores en campo se realizan tradicionalmente en laboratorios utilizando el análisis cromatográfico de gases-masas. Sin embargo, recientemente se han desarrollado técnicas e instrumentos de análisis para la rápida medición de niveles de BPC en el mismo sitio de muestreo (Cooper et. al., 1985) A continuación se describen algunos procesos:

- 4.6.1. ***Espectrómetro Miran 980*** para el análisis de BPCs derramados en suelos con programas de acción regular y rutinarios.
- 4.6.2. ***Detector de Fluorescencia de Rayos X***. El espectrómetro Horiba, llamado MESA 200 es un detector portátil de niveles de BPC, basado en la tecnología de fluorescencia de rayos-X que consiste en la determinación de los niveles de concentración de BPCs en una muestra de aceite mineral; es un método indirecto, que en realidad mide el contenido total de cloro en el aceite, ya que la concentración de cloro en el fluido es proporcional a la concentración de BPC; el medidor del indicador de cloro, se puede calibrar para leer la concentración de BPCs en términos de ppm.
- 4.6.3. ***Estuche Químico de Prueba de Campo***. La corporación Centec Analytical Services Inc, ha desarrollado una prueba de campo de análisis de BPCs, el equipo utiliza un método químico para la determinación inmediata de la concentración de BPC en los aceites de los transformadores eléctricos; el procedimiento de 3 pasos tarda menos de 5 minutos por muestra, el nivel de concentración de BPC se indica en términos de niveles de riesgo establecido a través de una pantalla LED. El alcance de identificación de la concentración de BPC es de hasta menos de 50 ppm; en éste método, los anillos del bifenilo son completamente separados de los átomos de cloro y la mezcla resultante no-BPC se analiza por medios electrónicos. Ya que este método destruye los BPCs en la muestra, la disposición de la muestra en reacción no presenta riesgo para el ambiente. La exactitud del método en el campo parece ser de 90 % con patrones de Askarel® conocidos y con muestras (Forrest, 1987).
- 4.6.4. ***Analizador de Contaminación por derrames de BPCs en Suelos***. El equipo es un Miran 1-A básico acoplado a un Espectrómetro Infrarrojo 980 con adaptación de reflexión interna múltiple (MIR por sus siglas en inglés) llamada también reflexión total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) de las celdillas a el Miran 980. El principio de operación está basado en el hecho de que la energía infrarroja es total e internamente reflejada dentro de un material óptico de alto índice refractivo por ejemplo ZnSe, que penetra una corta distancia dentro de la muestra de suelo; si la muestra absorbe energía desde longitudes de onda específicas, la intensidad del rayo se disminuye y generalmente se expresa como una absorbancia que está relacionada con concentración. El sistema tal como se desarrolló, se puede utilizar para la determinación de concentraciones de BPC en los suelos y en líquidos conteniendo sólidos suspendidos; este equipo elimina los problemas de error por dilución algunas veces encontrados con el método cromatográfico (Forrest, 1987).

4.6.5. La Electric Power Research ha desarrollado un conjunto de pruebas kit para determinar la presencia de iones cloro y BPCs en muestras de aceites. El sistema consta de una fase líquida acuosa dentro de una cápsula que contiene una cantidad determinada de un metal alcalino; la cápsula está a su vez, dentro de otra que contiene una determinada cantidad de mercurio valorado, el cual reacciona con los iones cloro, y un colorante indicador que reacciona con el ion mercurio; y de esta manera, las cantidades determinadas del metal álcali, el mercurio valorado y el colorante indicador, proporcionan una detección visual de la presencia de los iones cloro y BPCs a una baja concentración en la muestra de aceite (Electric, 1988).

Recientemente, se ha desarrollado un aparato para el análisis de BPCs en campo por método de desorción térmica con cromatografía de gases y espectrometría de masas, para la detección de BPCs en sitios de disposición de residuos peligrosos; lográndose análisis semicuantitativos en 2.5 min. por muestra y análisis cuantitativos completos en 20 min incluyendo el tiempo de preparación de la muestra con límites de detección de ppm (Robbat et. al., 1992).

La U.S. EPA, no dictamina el método por el cual hacer las determinaciones de la concentración de BPC en muestras ambientales, pero en 1985 promovió un método analítico (**Método 680**) para la determinación de BPCs en agua, suelos y sedimentos por cromatografía de gases-masas así como también una segunda revisión de un método para el análisis de varios compuestos clorados en los productos comerciales y residuos peligrosos (Kimbrough y Jensen, 1989). Para el desarrollo de estos métodos, la EPA ha seguido las directrices de análisis influenciadas en gran medida, por la intervención de la *Sociedad Americana para la Prueba de Materiales* (ASTM por sus sigla en inglés) del *Comite D-27* al desarrollar el método **ASTM D-4059**. Los métodos de la U.S. EPA y la ASTM son compatibles y dan resultados similares.

En el **Método ASTM D-4059** la muestra de aceite por analizar se diluye con hexano y se purifica con florisil (catalizador gel de magnesio/silicato) para retirar las interferencias, una fracción de 4 µl. de esta mezcla preparada, se inyecta al cromatógrafo utilizando un detector de captura de electrones.

La identificación del tipo de Aroclor en la muestra, se realiza por comparación con los cromatogramas obtenidos con los estándares internos de los diferentes tipos de Aroclor® y posteriormente, se calcula la concentración de los BPCs en la muestra (Forrest, 1987).

La tabla IV-3 presenta los procedimientos analíticos más utilizados para BPCs. Estos procedimientos incluyen los desarrollados por la U.S EPA (para halocarburos), U.S. EPA (B100), U.S. EPA (5,A,[1]). Se contemplan el tipo de material contaminado, interferencias y tipo de matriz como son: agua, agua residual, suelo, sedimentos, lodos, aire, emisiones por combustión e incineración, Askareles de capacitores, fluidos de transformadores, aceites gastados, mezclas de bencenos clorados, pigmentos, comida, leche, sangre y tejido adiposo.

Tabla.No.IV-3.- Procedimientos estándares de análisis para BPCs (Erickson, 1986).

D3534-80	agua	Hexano/CH ₂ Cl ₂	(Florisil) (Sílica Gel)	PGC/ECD ^a	NO	Area total o Webb-McCall Area	0.1 µg/l	NO	ASTM, 1981a
608	agua	CH ₂ Cl ₂	(Florisil) (S remoción)	PGC/ECD	NO		0.04-0.15 µg/l	SI	EPA, 1984e; Longbottom y Lichtenberg, 1 982
625	agua	CH ₂ Cl ₂	ninguno	PGC/EIMS (CGC)	SI	Area	30-36 µg/l	SI	EPA, 1984f; Longbottom y Lichtenberg, 1 982
304h	agua	Hexano/CH ₂ Cl ₂ (85/15)	Florisil/Sílica gel (CH ₃ CN) (S remoción)	PGC/ECD o HECD	SI	Areas sumadas o Webb-McCall	NS	SI	EPA, 1978
EPA (por productos)	agua	Varios	Varias	HRGC/EIMS	SI	Picos individuales	NS	SI	Erickson et al., 1982, 1983 d; EPA, 1984c
ANSI	agua	Hexano	(H ₂ SO ₄) (Saponificación) Alúmina	PGC/ECD	NO	Picos individuales o sumados	2 ppm	SI	ANSI, 1974
Monsanto	agua	Hexano	Alúmina	PGC/ECD	NO	Alturas de picos individuales o totales	2 ppb	NO	Moein, 1976
UK-DOE	agua	Hexano	Sílica Gel	PGC/ECD	NO	NS	106 ng/l	NO	UK- DOE, 1979; Devenish y Harling- Bowen, 1980
D3304-74	aire agua suelo sedimentos	DI Hexano H ₂ O/CH ₃ CN	(H ₂ SO ₄) (Saponificación) (Alúmina)	PGC/ECD	NO	Area total	NS	SI	ASTM, 1981b
EPA (homólogo)	sólidos y líquidos	Varios	Varios	HRGC/EIMS	SI	Picos individuales	NS	SI	Erickson et al., 1985c
EPA 625-5	lodos	CH ₂ Cl ₂	Florisil, Sílica Gel, o GPC	HRGC/EIMS o PGC/EIMS	SI	Area	NS	SI	Haile Lopez- Avila, 1984
EPA (hidrocarburos halogenados)	Lodos	Hexano/CH ₂ Cl ₂ Acetona (83/15/2)	GPC S remoción	PGC/ECD	SI	Altura o área de picos	NS	SI	Rodríguez et al., 1980
Contaminantes prioritarios	Lodos	CH ₂ Cl ₂ (Fracciones base/neutras y ácidas)	GPC	PGC/EIMS	SI	NS	NS	SI	EPA, 1979e
B100	Lodos	CH ₂ Cl ₂ (3 fracciones)	GPC Sílica Gel	HRGC/EIMS o PGC/EIMS	SI	NS	NS	SI	Ballinger, 197 8
8080	Deshechos sólidos	CH ₂ Cl ₂	(Florisil)	PGC/ECD	NO	Area	1 µg/l	SI	EPA, 1982e
8250	Deshechos sólidos	CH ₂ Cl ₂	Ninguno	PGC/EIMS	NO	NS	1 µg/l	SI	EPA, 1982e
8270	Deshechos sólidos	CH ₂ Cl ₂	Ninguno	HRGC/EIMS	NO	NS	1 µg/l	SI	EPA, 1982e
EPA (derrames)	No especificados	hexano/acetona	(CH ₃ CN) (Florisil) (Sílica Gel) (Mercurio)	PGC/ECD	NO	Area total o Webb-McCall	NS	NO	Beard y Schaum, 1978
EPA	Suelos y sedimentos	acetona/ hexano	Florisil Sílica Gel (S remoción)	PGC/ECD	NO	Computadora	NS	SI	EPA, 1982d
Monsanto	Sedimentos	CH ₃ CN	Saponificación H ₂ SO ₄	PGC/ECD	NO	Altura de picos individuales o	2 ppb	NO	Moein, 1976

ANSI	Sedimentos, suelo.	CH ₃ CN	Alúmina Saponificación H ₂ SO ₄ Alúmina	PGC/ECD	NO	Picos simples o suma de picos	2ppm	SI	ANSI,1974
EPA (por producto)	Aire colectado, Florisil XAD-2	Hexano	(H ₂ SO ₄) (Florisil)	HRGC/EIMS	SI	Picos individuales	NS	SI	Erickson et al., Erickson,1984c
EPA(aire)	Aire colectado cerca de sitios con residuos peligrosos o PUF	hexano/éter	Alúmina	PGC/ECD	NO	Area total o altura de picos	10-50 ng/m ³	NO	Lewis,1982
EPA (pilas)	Emisiones de incineradores y aire colectado sobre florisil	Hexano	(H ₂ SO ₄)	Percloración PGC/ECD	NO	Area	10 ng	NO	Haile y Baladi,1977; Beard y Schaum,1978
EPA	Fuentes de combustión colectadas sobre florisil	Pentano o CH ₂ Cl ₂	(Florisil/Silica gel)	PGC/MS	SI	Area/homologo	0.1 ng/inv.	NO	Levins et al.,1979
EPA(Incineradores)	Gas apilado	Pentano/metano		PGC/MS	SI	Picos individuales	NS	SI	Beard y Schaum,1978
ANSI	Aire (con tolueno)		(H ₂ SO ₄) (Saponificación) (Alúmina)	PGC/ECD	NO	Picos individuales	2 ppb	SI	ANSI,1974
NIOSH(P&CAM 244)	Aire colectado o forisil	Hexano	Ninguno	PGC/ECD	NO	Altura de picos o área de la curva estándar o Webb-MacCall	0.01 mg/m ³	NO	NIOSH,1977a
NIOSH(P&CAM 253)	Aire colectado o forisil	Hexano	Ninguno	PGC/ECD Percloración	NO	Altura de picos o área de la curva estándar	0.01 mg/m ³	NO	NIOSH,1977b,c
EPA (gas)	Muestras de gas natural con florisil	Hexano	H ₂ SO ₄	PGC/ECD		Area total, altura de picos o Webb-MacCall (Percloración)	0.1-2 µg/m ³	NO	Harris et al.,1981
EPA [5.A,(3)]	Sangre	Hexano	(Florisil)	PGC/ECD	NO	NS	NS	NO	Watts,1980
EPA [5.A,(1)]	Adiposo	Pet. Eter/CH ₃ CN	Florisil	PGC/ECD	NO	NS	NS	SI	Watts,1980
EPA (9,D)	Adiposo	Pet. Eter/CH ₃ CN	Saponificación Florisil	TLC	NO	Semicuantitativa	10 ppm	NO	Watts,1980
EPA (9,B)	Leche	Acetona/hexano	CH ₃ CN Florisil Silica ácida	PGC/ECD	SI	Picos individuales	50 ppb	SI	Watts,1980 Sherma,1981
AOAC (29)	Comida	CH ₃ CN/pet. Eter	Florisil MgO/diatomacea Saponificación	PGC/ECD	NO	Area total o picos individuales	NS ^a	NO	AOAC,1980a
Japón	Comida	Pet. Eter/CH ₃ CN	Sílica Gel Saponificación (Florisil)	PGC/ECD	SI	Suma de áreas percloración	NS	NO	Tanabe,1976
PAM	Comida	Pet. Eter/CH ₃ CN	Sílica ácida (Saponificación) (Oxidación) (Florisil)	PGC/ECD PGC/HECD NP-TLC (RP-TLC)	NO	Area	NS	NO	FDA,1977
AOAC (29)	papel cartón	y Saponificación	Florisil MgO/diatomacea Saponificación	PGC/ECD	NO	Area total o picos individuales	NS ^a	NO	AOC,1980b

D3303-74	Askareles de capacitores	DI ^a	Ninguno	SCOT HRGC/FID	NO	Area total	2.8*10 ⁻² mol/l	NO	ASTM,1980a
D4059-83	Aceite mineral	Dilución con hexano o isoocetano	Florisil barro (H ₂ SO ₄) (Columna con florisil)	PGC/ECD (PGC/HECD)	SI	Picos individuales o Webb-MacCall	50 ppm	NO	ASTM,1983
EPA (aceites)	Fluidos de transformados o aceites gastados	DI	(H ₂ SO ₄) (Florisil) (Alúmina) (Sílica Gel) (GPC), (CH ₃ CN)	PGC/HECD /ECD /EIMS (HRGC)	NO	Picos individuales	1 mg/kg	SI	EPA,1981 Bellar y Lichtenberg,1981
EPA(por productos)	Productos o desechos	Varios	Varios	HRGC/EIMS	SI	10 isómeros	NS	SI	Erickson et al.,1982,1983 d; Erickson,1984
DCMA	3 tipos de pigmentos	A.Hexano/H ₂ SO ₄ B.CH ₂ Cl ₂	Ninguno Florisil	PGC/ECD	NO	Altura de picos totales/homólogos	1ppb/homól.	SI	DCM,1982
DOW	Bencenos clorados	DI	Ninguno	PGC/EIMS	SI	Picos individuales	NS	SI	DOW,1981
EPA(grupos isómeros)	No especificados	No señalado	No señalado	HRGC/EIMS	SI		NS	SI	EPA,1984d

- a No especifica detalles
 - b Inyección directa o diluida e inyectada
 - c Las técnicas en paréntesis son descritas como opciones en el procedimiento
 - d También Cromatografía de Gases con columna empacada (packed column gas chromatography,PGC) con microcoulómetro o conductividad electrolítica.
- CC Control de Calidad.
LD Limite de Detección.

Es difícil precisar las ventajas de un determinado método o técnica de cromatográfica sobre otra, sin embargo esto puede hacerse eligiendo el método analítico más adecuado para identificar y cuantificar BPCs en cada caso particular dependiendo del propósito de estudio en particular y los objetivos que se deseen alcanzar es decir, de la necesidad de realizar estudios en detalle de todas y cada uno de las posiciones de cloro en los isómeros o bien, para determinar los congéneres de BPC de mayor concentración en las mezclas comerciales o en su caso, para el estudio de registros toxicológicos. Además, se deberá tomar siempre en cuenta las características específicas de la matriz en estudio para estandarizar el método más adecuado al caso pensando en la necesidad de la reproducibilidad de los resultados.

Las mediciones ambientales son difíciles de realizar por las bajas concentraciones de BPCs existentes en los diferentes tipos de matriz (agua, aire, suelos y sedimentos) y la presencia de sustancias interferentes además de las complicaciones derivadas al analizar mezclas de BPCs en lugar de un compuesto específico, lo que provoca un serio problema en el análisis cuantitativo, ya que los análisis implican la determinación de compuestos con diferentes grados de cloración comprendiendo un amplio rango de pesos moleculares y propiedades físicas y químicas muy diversas. Sin embargo, para realizar éstos análisis rutinarios de BPCs es recomendable utilizar técnicas cromatográficas modernas como la cromatografía de líquidos de alta resolución aplicable bajo ciertas condiciones de operación; así como con cromatografía de gases con detector de captura

de electrones con la que se pueden alcanzar excelentes grados de resolución y separación de otros compuestos orgánicos clorados como plaguicidas y dioxinas. Por otra parte, el uso de columnas capilares de gran resolución y el empleo del cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas permite la identificación de prácticamente todos los isómeros presentes en las mezclas comerciales y aunque a veces es difícil distinguir entre dos isómeros con el mismo número de átomos de cloro sólo por su espectro de masas, se puede acudir a los datos de tiempos de retención para facilitar su identificación además del uso de estándares comerciales.

La evaluación de las muestras desde el punto de vista toxicológico, debe realizarse mediante el ensayo biológico que permita establecer la peligrosidad de la muestra a analizar, y si estos resultan positivos, se deberán realizar los análisis químicos utilizando la cromatografía de gases-masas para determinar los isómeros tóxicos minimizando previamente las posibles interferencias.

Capítulo V.

EFECTOS EN SALUD Y MEDIO AMBIENTE

5. EFECTOS EN SALUD Y MEDIO AMBIENTE

La Conferencia Americana de Higienistas Industriales de Estados Unidos de América que clasifica los compuestos por su toxicidad, ha registrado a los BPCs como una toxina clase 1-2, lo que significa que estos compuestos son no-tóxicos a ligeramente tóxicos (CFR, 1990). Sin embargo, la posición de la Agencia de Protección Ambiental (U.S. EPA) en la introducción a su manual de inspección del Acta de Control de Sustancias Tóxicas (T.S.C.A. por sus siglas en inglés) los considera como compuestos potencialmente carcinogénicos (U.S.EPA, 1980) debido a que existen evidencias de ciertos estudios llevados a cabo en animales, en los cuales se ha demostrado la formación de nódulos y carcinomas en el hígado de ratas (Ioto et. al., 1974); existen además, evidencias de que el Aroclor® 1254 actúa como promotor de tumores (Preston et. al, 1981).

Aunque por mucho tiempo se ha sabido que los BPCs son peligrosos, sólo hasta hace algunos años se ha reconocido que son una amenaza para la salud y el medio ambiente ya que se les ha encontrado en concentraciones importantes en la leche materna (Gosselin y Gleason, 1979) tejidos de peces y otros organismos de vida silvestre (Vojinovic et. al., 1992) además de vías fluviales, sedimentos, y océanos.

Su característica de liposolubilidad, los hace que sean bioacumulables en los tejidos grasos, con lo que su paso a escalones superiores de la cadena trófica resulta inmediato y su acumulación en la biota tienden a ser 104 veces mayor que en el agua o aire que los circunda (Dobson y Van Esch, 1993).

5.1. FUENTES DE CONTAMINACIÓN POR BPCs

Los principales mecanismos de contaminación de BPCs son los vertidos y derrames de aceites y residuos que contiene BPCs directamente al mar o en sistemas de agua superficial, además de:

- ◆ Dispersión en los suelos de líquidos que contienen BPCs por las industrias que los producen o utilizan como lubricantes o conductores térmicos.
- ◆ Depósito o abandono de materiales contaminados (transformadores, capacitores etc.) en vertederos a cielo abierto.
- ◆ Exposición de sustancias plastificantes fabricadas con BPCs.
- ◆ Volatilización durante la combustión de materiales contaminantes y emisión en procesos de incineración de los BPCs u otros materiales.

5.2. PRINCIPALES CASOS DE CONTAMINACIÓN POR BPCs

Los dos incidentes de contaminación por BPCs más importantes que han hecho historia y por los que se ha puesto mayor atención a este compuesto químico como agente altamente contaminante han sido: el incidente de Yusho y la contaminación del río Hudson.

El incidente de 1968 en Yusho Japón, ocasionó un brote masivo de envenenamiento por alimentos, debido a la ingestión de aceite comestible contaminado con BPCs y otros compuestos químicos; aunque después de algunos años el BPC fue exonerado como el culpable por medio de estudios que demostraron que el aceite contenía además grandes cantidades de otros hidrocarburos clorados, tales como de (PCDF) policloro dibenzo furanos con 5 ppm, (PCTs) policloroterfenilos con 1000 ppm y sólo cerca de 100 ppm de BPCs.

Se mencionan con frecuencia también, los incidentes de contaminación masiva del Río Hudson de los Estados Unidos en el cual la Compañía General Electric que manufacturaba capacitores con BPCs en dos plantas localizadas adyacentes al Río vertían esporádicamente grandes descargas de BPCs al medio; lo cual provocó exhaustivos estudios analíticos en la zona, estimándose un total de 600 Tm de BPCs vertidos.

La contaminación de la cuenca del Río Hudson excede en nivel y extensión cualquier otra área contaminada con BPCs en los Estados Unidos de tal manera que la concentración de la contaminación en los sedimentos es de ordenes de magnitud mucho mayores que los de otros sistemas contaminados como por ejemplo los encontrados en el Lago Ontario, Lago Michigan, la Bahía Escambia de Florida e incluso de los suelos de la Compañía Monsanto que producía BPCs (Erickson, 1986).

5.3. RUTAS DE EXPOSICIÓN Y EFECTOS EN HUMANOS

Existen tres rutas potenciales por las cuales el humano esta ambientalmente expuesto a la contaminación por BPCs: a través de la inhalación de aire contaminado, ingestión de agua y por los alimentos contaminados; la absorción por la piel es otra posibilidad pero ésta se realiza predominantemente por exposición ocupacional (Strachan, 1988).

Por estudios en personas expuestas accidentalmente, se ha demostrado que los síntomas más comunes de exposición en el hombre son los daños hepáticos y cambios en los analitos séricos relacionados con el hígado (bilirrubina y transferasas β -glucocloradas, etc.)

Un efecto común reportado es un problema de la piel llamado cloracné en personas que han estado expuestas a BPCs y varios hidrocarburos clorados (Smith, 1992).

Los efectos en los niños se deben a la exposición al BPC durante el desarrollo fetal y después del nacimiento al ser alimentados con leche materna contaminada (Angel, 1965).

5.4. EFECTOS EN ANIMALES

La toxicidad aguda de las mezclas de los BPCs depende del contenido de cloros en la molécula. Los efectos agudos y subagudos en animales provocan hipertrofia del hígado debido principalmente a la inducción enzimática, manifestándose principalmente con daños de degeneración del tejido adiposo y necrosis centrolobular; la piel también se afecta por hiperplasia, hiperqueratosis y dilatación sistica. La concentración de BPCs en los diferentes órganos y tejidos depende de su contenido de lípidos con excepción del cerebro. Debido a la rápida absorción en la sangre, los BPCs pueden intervenir en el metabolismo Hem demostrado por el incremento en el contenido de porfirina (Angel, 1970; Smith, 1992).

Los factores que determinan el grado de bioacumulación de todos los congéneres de BPCs en los tejidos adiposos son: la duración y nivel de exposición, la estructura química del compuesto y la posición y patrón de sustitución, pero en general los congéneres altamente clorados son los que se bioacumulan más fácilmente (Dobson y Van Esch, 1993).

Los BPCs son rápidamente absorbidos por el tracto gastrointestinal después de su ingestión o por el hígado después de su inhalación; los tumores hepatocelulares se producen en ratas después de un largo período de aplicación oral de BPCs. Otro efecto observado es la acción de inmunosupresión en mamíferos (Smith, 1992).

Estudios llevados a cabo en animales, han demostrado efectos altamente peligrosos como el efecto lipofílico, al administrarse 6 cloro bifenilo (6-CB) en la dieta de ratas durante un período de dos semanas; encontrándose altas concentraciones en los tejidos de la piel, músculos e hígado, provocando la movilización lipídica (Jondorf y Wyss, 1983; Wyss y Muhlebach, 1982).

Posteriormente, en un período de restricción calórica la concentración del 6-CB decrece en el tejido adiposo de estos animales, este fenómeno de movilización y de cambios subsecuente se demostró también en ratones recién nacidos en los cuales la distribución del 6-CB se acumuló en depósitos de grasa durante el período posterior a la gestación y lactancia (Vodicnik y Lech, 1980). Posteriormente se detectaron cambios en la concentración del BPC en los tejidos adiposos debido a un ligero rango de excreción del 6-CB dentro de los adipositos "in vivo" (Colburn y Mathew, 1979). Estas rutas de metabolización dependen de la estructura molecular del BPC, del grado y posición de los cloros; generalmente los más clorados parecen ser los más rápidamente eliminados en las heces fecales y orina (Dobson, 1993). Se piensa que los liposomas son los vehículos de transporte de éstos a los lípidos demostrado por la movilización de la lipólisis (Angel, 1965 y 1970).

La hidroxilación es la ruta de transformación en la mayoría de los mamíferos dando por resultado productos mono- y di-hidroxiclorobifenilos principalmente, además de compuestos de metilsulfona derivados de los BPCs que son excretados de los tejidos a través de la orina (Safe, 1990).

Estudios en mamíferos han demostrado la eliminación del 50 % de los BPCs con 1,2,5 y 6 átomos de cloro por molécula; los factores críticos que afectan el grado de biotransformación son el número de cloros y la posición de éstos en los anillos además de la especie de animal por ejemplo, los perros y ratas eliminan en un solo día el 50 % de la dosis con la excreción de 2,3,6-hexaclorobifenilo como metabolitos mientras que los monos requieren 6 días para eliminar la misma cantidad (Matthews y Anderson, 1975; Kato et. al, 1980; Sipes et. al., 1979 y 1982).

Ciertas mezclas de BPCs tienen la habilidad de alterar los procesos reproductivos en las especies mamíferas, algunas veces aun en dosis que no causan otros signos de toxicidad; los datos que se tienen sobre animales y humanos, indican que la exposición prenatal a los BPCs puede ocasionar varios efectos tóxicos en el desarrollo, el cual se incrementa con el porcentaje de cloros; se han demostrado también efectos postnatales en animales prematuros durante el período de lactancia.

La toxicidad de los diferentes isómeros de BPCs es variable y difícil de evaluar ya que su acumulación en los organismos marinos suele ir acompañada de la acumulación de otros compuestos tales como plaguicidas o metales pesados que, en principio, cabe pensar son más

tóxicos. Algunos de los efectos específicos que han sido comprobados son: influencia sobre la productividad del fitoplancton, además de provocar efectos dañinos en invertebrados de agua dulce; también se ha demostrado que los BPCs dañan el sistema reproductivo de las aves y mamíferos marinos y son tóxicos para los peces aun a niveles muy bajos, con efectos fisiológicos subletales, tales como anomalías en el desarrollo del sistema óseo y órganos reproductivos (Vojinovic et. al., 1992).

El principal requerimiento estructural para la determinación de la toxicidad de los BPCs es su estereoquímica planar (ausencia de sustituciones *orto*) similar a la molécula de 2,3,7,8-TCDD o bien presencia de dos posiciones *para* y al menos dos *meta* sustituidas; determinadas en base a sus factores de equivalencia de toxicidad que representa una herramienta para comparar la toxicidad relativa de un grupo de congéneres con el compuesto más tóxico conocido (Shaw, 1993), como se muestra en la tabla V-1.

Tabla No. V-1.-Valores de Factores de Equivalencia de Toxicidad (FET) para congéneres coplanares, mono-orto y di-orto sustituidos (Safe, 1990).

Coplanares	
3,3',4,4'- tetra cloro bifenilos	0.01
3,4,4',5,- tetra cloro bifenilos	Datos insuficientes
3,3',4,4',5- penta cloro bifenilos	0.01
3,3',4,4', 5,5'- hexa cloro bifenilos	0.05
Mono <i>orto</i> sustituidos	0.001
Di- <i>orto</i> sustituidos	0.00002

Para considerar los BPCs como una sustancia con cierta toxicidad, es necesario estudiar dos factores: a) su toxicidad aguda, la cual es evidente de inmediato por causar un alto índice de mortalidad en un determinado bioensayo o que provoque otros efectos tóxicos y b) su toxicidad crónica, la cual es el resultado de una lenta acumulación del compuesto en el organismo que puede provocar efectos no letales o letales a largo plazo.

Por lo tanto, si la toxicidad aguda de un compuesto es alta, se reconoce como un contaminante tóxico y si por el contrario la toxicidad aguda es baja, los trastornos que el compuesto provoque en el organismo pasarán desapercibidos hasta que los efectos crónicos sean evidentes en grandes núcleos de población caso común en los BPCs por los que se les considera potencialmente peligrosos para la vida humana y el equilibrio ecológico.

Los efectos más importantes de los BPCs los ha revisado ampliamente el equipo de investigación de Wassermann (1979) y se encuentran resumidos en la tabla V-2.

Tabla V-2.- Concentración de BPCs en animales (Wassermann, 1979).

Organismo:	Concentración ($\mu\text{g/g}$)
Organismos Marinos	
Zooplankton	<0.003 - 1.055
Mariscos	<0.003 - 7
Focas	3 - 212
Ballenas y Delfines	0.012 - 147
Peces	
Peces de agua dulce (USA)	0.1 - 15
Peces Marinos	0.03 - 190
Aves	
De Norteamérica	0.1 - 14,000
De Europa	0.5 - 9,570
Huevos	0.1 - 434
Animales Terrestres	0.01 - 45
Humanos	
Tejido Adiposo (población general)	0.2 - 10.0
Plasma (población general)	0.01 - 0.029
Plasma (exposición ocupacional)	0.036 - 1.9
Tejido Adiposo (Incidente de Yusho)	0.7 - 75.5
Plasma (Incidente de Yusho)	
Leche	0.02 - 0.015
Lípidos extraídos de leche	0.01 - 0.39
	0.01 - 18.9

El grado de toxicidad asociada a los BPCs varía entre las especies, en que actúen debido a su alta velocidad y capacidad metabólica, además de los mecanismos fisiológicos de cada especie en particular, es por ello que actualmente se están re-evaluando los estudios para afirmar los efectos crónicos pero sus riesgos están bien identificados (Mendoza, 1994).

5.5. PRINCIPALES EFECTOS

Existen grandes controversias aun en lo referente a los principales efectos que causan los BPCs en los diferentes organismos de la tabla V-3; por lo cual, el establecer una posición a favor o en contra de éstos temas es sumamente complicado, por ello solo se hará mención de algunas referencias:

5.5.1. CARCINOGENICIDAD

Frecuentemente se menciona que los BPCs son potencialmente cancerígenos; sin embargo el eslabón real entre el cáncer humano y los BPCs es débil, pero existen estudios iniciales que sugieren una relación entre la exposición al BPC y el cáncer en humanos inferido por el incremento significativo en los niveles de proteínas oncogénicas y ciertas aberraciones cromosomales en linfocitos periféricos sanguíneos en trabajadores expuestos a BPCs. De acuerdo con esto, existen estudios realizados en animales los cuales indican que el potencial de oncogenicidad depende del grado de exposición a los BPCs. No obstante, un estudio llevado a cabo a largo plazo por la Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH, por

sus siglas en inglés), examinó trabajadores de una fábrica de condensadores con historial de exposición a los BPCs sin encontrar incrementos en la incidencia de cáncer (Lang, 1992).

5.5.2. MUTAGENICIDAD

Los BPCs han sido investigados por su actividad mutagénica utilizando varias cepas de la bacteria *Salmonella sp.* ninguna de las cuales ha demostrado tener signos de mutagenicidad (Schoeny et. al., 1979; Shakim et. al., 1979); también se ha investigado en células de linfocitos humanos con el Aroclor 1254 (Hoopingartner et. al., 1972), con la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* utilizando mezclas de BPCs con 30% y 50% de cloro (Nilsson y Ramel, 1974) y *In vivo* con ratas utilizando Aroclor® 1242 y 1254 (Green et. al., 1975); ninguno de estos sistemas mostró signos de anomalías cromosomales u otras evidencias de actividad mutagénica por BPCs. Sin embargo, los estudios realizados por Wyndham et. al. (1976), utilizando mezclas de Aroclor de bajo nivel de cloración (Aroclor® 1221 y 4-clorobifenilo) muestran un ligero efecto mutagénico.

5.5.3. TERATOGENICIDAD

Los BPCs han sido descritos como potencialmente teratogénicos (Welsch, 1983) por causar malformaciones en animales como aves y ratones (Tumasonis et. al., 1973); en humanos se han encontrado varios efectos teratogénicos aunque no malformaciones (Harada et., al., 1976; Jacobson et. al., 1983).

5.5.4. EFECTOS EN PLANTAS

Existe muy poca bibliografía relativa a los efectos sobre las plantas, debido probablemente a su aparente insensibilidad a la mayoría de las sustancias organocloradas (Strek, 1981). La transferencia de BPCs del suelo a los vegetales se lleva a cabo principalmente por adsorción en la superficie externa de los vegetales (Dobson y Van Esch, 1993) como lo indican los estudios realizados sobre pequeñas translocaciones de BPCs marcados desde un punto de aplicación en la hoja al resto del vegetal con existencia de pequeñas pérdidas del isótopo marcado, esto sugiere la volatilización del BPC; sin embargo, existen también pequeñas translocaciones del compuesto en el interior de los vasos conductores del vegetal (Weber y Mrozeck, 1979).

5.6. CONTAMINACIÓN DEL AMBIENTE

Los BPCs se han utilizados durante más de sesenta años, pero su presencia en el ambiente no se determinó sino hasta que el detector de captura de electrones se introdujo en los análisis de cromatografía de gases (Colbrun y Mathew, 1979). En 1966, los BPCs se identificaron como contaminantes (Wasserman et. al., 1979) e investigaciones sucesivas han demostrado que son ubicuos (Tanabe et. al., 1983).

Tabla No. V-3.- Efectos y manifestaciones comunes de la exposición a los BPCs en animales (Safe et. al., 1987)

Hepatotoxicidad:
Hepatomegalia; hiperplasia del conducto biliar; proliferación de ER suave, necrosis focal; degeneración de grasas. Inducción de enzimas microsomales, implicaciones en el desbalance hormonal con repercusiones en la tiroides, páncreas y aparato reproductor. Agotamiento de las vitaminas solubles grasas (especialmente las A) Porfiro.
Inmunotoxicidad:
Atrofia de los tejidos linfóides Reducción de los leucocitos y linfocitos circulantes Supresión de las respuestas de los anticuerpos Incremento de la susceptibilidad a los virus Supresión de la muerte celular natural
Neurotoxicidad:
Respuesta de comportamiento anómalo Alteraciones en los niveles de catecolaminas Depresión espontánea de la actividad motora Desarrollo de déficits Adormecimiento de las extremidades
Reproducción:
Incremento de aborto; bajo peso de recién nacidos Decrecimiento de la supervivencia Incremento del período del estrés Mortalidad embrionaria y fetal Efectos teratogénicos fuertes (especialmente en aves) Cambios funcionales bioquímicos y neurológicos Decrecimiento de la libido, decremento de espermatozoides en número y movilidad
Aparato Gastrointestinal:
Hiperplasia gástrica Ulceraciones y necrosis
Aparato Respiratorio:
Bronquitis crónica; tos crónica Decrecimiento de la capacidad vital
Toxicidad Dérmica:
Cloroacné Hiperplasia e hiperqueratosis del epitelio Edema; alopecia
Efectos Mutagénicos:

Todas la mezclas comerciales de BPCs son potencialmente mutagénicas.

Efecto Carcinogénico

Cambios preneoplásticos

Cambios neoplásticos (a grandes dosis)

Considerados como promotores y contribuyentes a desarrollo de cáncer

Atenuan otros carcinogénicos bajo ciertas condiciones

Se ha estimado que cerca de 300,000 Tm han entrado al medio ambiente desde el inicio de su producción en 1929 y una cantidad cercana a las 450,000 Tm se encuentran aún en servicio o en vertederos controlados (Reineke, 1988).

Los niveles de concentración que se pueden encontrar en el medio ambiente van desde pg/m^3 en la atmósfera, ppt en la superficie del agua y nieve, ppb en suelos y sedimentos y hasta ppm en huevos de aves acuáticas, tejido adiposo de peces y humanos y en la leche materna (Kolak, 1988).

En áreas industriales y otros centros de trabajo, los niveles de BPCs en el aire pueden ser muy altos bajo ciertas condiciones; por ejemplo, en las naves de producción de transformadores o capacitores, se han encontrado niveles superiores a $1000 \mu\text{g/m}^3$. En el caso de incendios o explosiones, se puede producir hollín que contienen niveles altos de BPCs de hasta $8 \mu\text{g/kg}$ de BPCs; en estos sitios, la ingestión, contaminación de la piel o inhalación de las partículas de hollín ha ocasionado serios problemas de exposición del personal (U.S.EPA, 1989). Además es necesario tener en consideración que la pirólisis de BPCs (a temperaturas inferiores a 800°C en presencia de oxígeno) produce mezclas complejas de compuestos clorados, incluyendo las dioxinas y dibenzofuranos, compuestos que son altamente tóxicos lo que puede magnificar el problema (Vodinic, 1980).

5.6.1. TRANSPORTE Y ACUMULACIÓN AMBIENTAL

A nivel mundial, se estima que existe alrededor de 370,000 Tm de BPCs y $7,8 \times 10^6$ Kg están aún en uso o bien depositados de diferentes maneras (Chen et. al, 1980). Existe un volumen considerable de datos sobre el análisis de BPCs en el aire, agua, tierra, sedimentos y biota; realizados por la Academia Nacional de Ciencias (NAS, por sus siglas en inglés) desde 1979 y de otros investigadores:

5.6.1.1. AIRE

Debido a sus propiedades fisicoquímicas los BPCs se han podido dispersar en todos los ambientes. Se les encuentran dispersos en la atmósfera en el vapor, bajo forma de partículas de aerosol o asociadas al particulado atmosférico; los BPCs se manifiestan como una persistencia en el medio ambiente, ya que su naturaleza hidrofóbica ocasiona una tendencia a transferirse a grandes distancias por difusión de la masa de aire encontrándose así, en los mares, océanos, zonas desérticas y bosques. Su descenso sobre la superficie terrestre ocurre a través de la precipitación

pluvial o por gravedad. En los registros de los análisis de precipitación pluvial la concentración de BPCs encontrados reflejan indirectamente los niveles de BPCs en el aire (Strachan, 1988) que generalmente son superiores a las concentraciones presentes en las aguas superficiales.

Por otro lado, la difusión natural en la atmósfera de cantidades importantes de estos contaminantes, permite considerar la vía aérea como la vía más importante para la distribución de los BPCs. Los distintos procesos que caracterizan estos fenómenos, como la evaporación, difusión, adsorción, transporte y depósito, dependen de las características fisicoquímicas de los distintos congéneres y de los equilibrios de partición en las distintas fases involucradas (aire, agua, vapor, partículas y sólidos), parámetros que generalmente están influenciados a su vez por numerosos factores ambientales, tales como la temperatura, humedad relativa y velocidad de la masa de aire (Wyss y Muhlebach, 1982).

5.6.1.2. AGUA

La superficie del agua se puede contaminar con BPCs por la precipitación atmosférica, por emisión directa de la fuente o por la mala disposición de los residuos que contienen BPCs (Dobson y Van Esch, 1993) los niveles de concentración a lo que se les ha encontrado están comprendidos entre los 100 y 500 ng/l en las aguas superficiales y del orden de los 0.05 a 0.6 ng/l en los océanos (Chen et. al., 1980).

Los BPCs se encuentran en el agua superficial a niveles detectables y cuando ésta contiene materia en suspensión los BPCs se absorben fácilmente en ellas; problema que suele ser eliminado fácilmente por su eliminación durante el tratamiento en la planta potabilizadora (Strachan, 1988).

Con base en los valores de los coeficientes de solubilidad y de partición *n*-octanol/agua los congéneres de BPCs de bajo contenido de cloro se absorben con menos fuerza que los más clorados (Dobson y Van Esch, 1993). En los mares, debido a su baja solubilidad en el agua salada, una vez que penetra el BPC en el medio marino se fija a las partículas en suspensión y acaba finalmente sedimentando. Se ha comprobado que en los sedimentos marinos, existe una buena correlación entre la materia orgánica y la concentración de BPCs y al igual que el DDT, ésta es la principal vía de entrada dentro de la cadena trófica.

Los coeficientes de transporte de masas a través del aire y agua se pueden calcular por medio de las constantes de Henry con la siguiente fórmula:

$$\lim_{c \rightarrow 0} \frac{C_g}{C_l} = H_1$$

Donde C_g es la concentración de la fase gaseosa, C_l es la concentración de la fase acuosa y H son las dimensiones de la constante de la ley de Henry que puede medir las concentraciones de ambas fases, las interrelaciones entre actividad y estructura. Se utilizan también los modelos de fugacidad del gas de las constantes de la ley de Henry para calcular la distribución de los BPCs en los compartimentos aire-agua (Dobson, 1993).

El transporte en agua, está gobernado por la solubilidad de los BPCs y debido a su relativa baja solubilidad (indicada por su alto coeficiente de partición octanol/agua, K_{wo}) los BPC están

fuertemente absorbidos en los sedimentos y materia particulada de los sistemas acuáticos (Dobson y Van Esch, 1993).

5.6.1.3. SUELOS Y SEDIMENTOS

Una vez que los BPCs se han dispersado en el agua se absorben por las partículas que constituyen la fracción en suspensión y tienden a depositarse en el fondo, permaneciendo fijados en los sedimentos de lagos y ríos, los cuales son ambientes de relativa baja reactividad, donde los BPCs se pueden acumular por décadas, o bien tener posible liberación hacia la fase de agua de la parte superior (Dobson y Van Esch, 1993).

La mayor parte de los BPCs derramados en la tierra permanecen en ella por grandes períodos de tiempo que van desde meses hasta años. En función de las características de suelo, por ejemplo: en los de composición ricos en humus y sustancias orgánicas, así como en los suelos arcillosos existe una mayor adsorción de estos compuestos; y se retienen sólo en una mínima proporción en los suelos arenosos.

En el suelo y sedimentos, la contaminación depende de las condiciones locales, pero en general se consideran variaciones de 0,01 a 2 mg/kg. En áreas contaminadas los niveles sobrepasan 500 mg/kg (Dobson y Van Esch, 1993).

La absorción de los BPCs en los sedimentos está controlada por el carbono orgánico total existente en ellos y la fuerza de absorción en ellos depende del coeficiente de sorción de cada congénere de BPCs en particular que se puede calcular a partir de su coeficiente de partición octanol/agua (K_{wo}).

5.6.1.4. BIOACUMULACIÓN

La principal ruta de asimilación de los organismos terrestres es a través de la cadena alimenticia y en los organismos acuáticos, directamente de los nutrientes contaminados y acumulados en sus tejidos grasos. Los mecanismos de transporte para la bioacumulación de BPCs están influenciados por los altos valores de K_{wo} unido a los factores de estereoquímica que juegan un importante papel en los proceso de metabolización o acumulación en los organismos. En organismos acuáticos, las relaciones entre el factor de bioconcentración ($\log K_B$) y K_{wo} no son lineales (sencillas), sino que siguen una distribución polinomial o compleja debida a una serie de factores que no siempre son los mismos en calidad y cantidad.

La bioacumulación en organismos bentónicos está esencialmente controlada por asimilación de los coloides contaminados en el medio líquido.

Por otra parte, los estudios de los factores de estereoquímica de la molécula de BPC han demostrado que los congéneres planares son los más fácilmente acumulables en combinación con los coplanares (con uno o dos sustituciones orto) los cuales poseen la mayor vida media comparada con los otros congéneres anteriores (Dobson y Van Esch, 1993).

5.6.1.5. CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS

Los alimentos para humanos pueden llegar a contaminarse con BPCs por tres rutas: 1) asimilación del medio ambiente por la ingestión de peces, aves, ganado (vía cadena alimenticia) y cultivos vegetales. 2) migración del contaminante de los materiales de empaquetamiento a los alimentos (generalmente bajos, cercanos a 1 mg/kg pero se han encontrado casos superiores a 10 mg/kg). 3) contaminación directa de los alimentos o de los alimentos de los animales por accidentes industriales (Dobson y Van Esch, 1993).

En contraste con valores estimados para el aire y el agua, la exposición humana vía alimentos es mucho más alta. Sin embargo, la estimación de la exposición de la población en general a través de los alimentos es mucho más difícil debido a la limitada información existente de los niveles de BPCs en los alimentos. Existen solo algunas referencias disponibles en las que se han detectado diferentes rangos de concentración de BPCs como se muestra a continuación:

20 - 240	µg/kg en grasa animal
5 - 2000	µg/kg en leche de vaca
30 - 80	µg/kg en mantequilla
10 - 500	µg/kg en tejidos de peces
< 10	µg/kg en vegetales, cereales y frutas.

En ciertas especies de peces (anguilas) y productos de pescado (hígado o aceite) se han encontrado niveles tan altos como 10 mg/kg (Goseline y Gleason, 1979). Existe muy poca información para productos de hortalizas y cereales (Strachan, 1988).

5.7. MODELOS DE DISTRIBUCIÓN

Existen ciertos estudios en los que se ha intentado desarrollar Modelos de distribución de la contaminación por BPCs; una aplicación obvia de estos modelos, es la determinación de la concentración y delimitación de la extensión de la contaminación por varios medios (agua, aire, suelo y biota) utilizando sus propiedades fisicoquímicas, en su aplicación se utilizan parámetros básicos, como las diferentes constantes de partición determinadas directamente o calculadas por una correlación empírica (Lassiter et. al., 1979; Mackay y Paterson, 1982; Roberts et. al., 1978). Los modelos poseen figuras que en teoría son aproximadamente iguales a las de la situación real en los cuales se han introducido procesos de transformación y fenómenos de advección natural del medio y precipitación pluvial; estos modelos básicamente se han aplicado en los Lagos de Canadá y el sureste de Estados Unidos (Strachan, 1988).

Existen además bancos de información que intentan coleccionar y organizar la información referente a casos de contaminación con BPCs de cuerpos de agua a lo largo de los Estados Unidos y Canadá mediante las bases del Banco de Datos de Calidad Nacional (NAQUADAT por sus siglas en inglés) y el Banco de Datos del Instituto de Investigaciones del Agua de los Grandes

Lagos (STATRFILE por sus siglas en inglés) con registros a partir de 1975; estos programas están realizados por regiones y por niveles de contaminación (Strachan, 1988).

Las referencias de los niveles de contaminación por BPCs en aire, agua, suelo, sedimentos y alimentos se encuentran resumidas en la tabla V-4; nótese que las unidades no son las mismas en todas las matrices lo que se ve reflejado por valores de ppb en el suelo, alimentos y sedimentos y ppt en agua, las concentraciones en todas las matrices generalmente alcanzan amplios rangos.

Tabla No. V-4.- Niveles de contaminación por BPCs en aire, agua, suelo y sedimentos (Erickson, 1984).

Matriz	Localidad	Concentración (BPC)	Referencia
Aire	Costa Antártica	0.06 - 0.2	Tanabe, 1983
	Grandes Lagos	0.1 - 0.5	Eisenreich, 1983
	Rural	0.1 - 2	Eisenreich, 1983
	Varias loc. de USA	0.02 - 36	NRC, 1979
	Aire marino	0.05 - 2.0	NRC, 1979
	Océano Atlántico	0.05	WHO, 1976
	Golfo de México	0.2 - 0.9	Giam, 1976
	Norte del Pacífico	0.54	Atlas, 1980
	Norte del Atlántico	1.84	Tanabe, 1982
	Oeste del Pacífico	0.06 - 1.2	Tanabe, 1982
	Norte del Atlántico	<0.05 - 0.2	Bidleman, 1976
	Norte del Atlántico	<0.05 - 1.6	Bidleman, 1981
	Tokio	20	Kimbrough, 1980
	Matsuyama, Japón	2 - 5	Kimbrough, 1980
	Suecia	<0.8 - 3.9	WHO, 1976
	USA	5	WHO, 1976
	Interior de oficinas contaminadas con balastras quemadas.	5,860	MacLeod, 1979
	Interior de oficinas.	39 - 620	MacLeod, 1979
	Sitios cercanos a derrames.	<10 - 190	MacLeod, 1979
	Vertederos controlados.	<10 - 190	MacLeod, 1979
	Subestaciones eléctricas.		
	Manufactura de transformadores.	2 - 18	MacLeod, 1979
	Sitios de derrame.	1 - 47	MacLeod, 1979
Chimeneas de gas	ENSCO, EL Dorado Arkansas.	17 - 5,900	MacLeod, 1979
		10 - 10,800	MacLeod, 1979
	Rollins, Deer Park, Texas.		Erickson, 1984 ^a
		12.10 ³ - 58.10 ³	
Aire de Naves Industriales (exposición ocupacional)	Massachusetts, Fabrica y uso de BPC en capacitores.		Erickson, 1984 ^a
		9.8	
Aire de Naves Industriales (exposición ocupacional)	Varios ambientes ocupacionales		
		0.1 - 5.8 .10 ⁶	NIOSH, 1977
		5 - 7 .10 ⁶	NIOSH, 1977
		0.1 - 10.10 ⁶	Kimbrough, 1980

Las principales generalizaciones extraídas de las revisiones de los estudios realizados en los Estados Unidos sobre los efectos de los BPCs han permitido establecer las siguientes perspectivas, sobre las cuales desarrollar conceptos sobre la toxicología ambiental de los BPCs:

- La atmósfera, aunque contiene relativamente un porcentaje bajo de movilidad ambiental de BPCs es el reservorio más dinámico (Safe, 1987).
- La concentración promedio de BPCs en la atmósfera en áreas metropolitanas (5 ng/m^3) es mucho más alta que los promedios de concentración de las zonas rurales y oceánicas (0.05 ng/m^3). Se han observado inclusive niveles promedio de 1000 ng/m^3 en áreas cercanas a plantas industriales.
- Las estimaciones de concentración de BPCs en la litosfera es muy incierta, pero se han detectado ciertas áreas con niveles altos de contaminación por ejemplo, todas aquellas cercanas a las plantas en donde se producía o utilizaron BPCs.
- Los vertederos controlados, en general, no han contribuido sustancialmente a la movilización global de estos contaminantes al ambiente. Sin embargo, se han detectado pérdidas en algunos de ellos con la consecuente contaminación de los mantos acuíferos cercanos (NAS, 1979).
- En áreas de baja concentración la pérdida desde los suelos orgánicos no es de importancia significativa, la pérdida de las superficies no orgánicas parece estar en equilibrio con la precipitación atmosférica.
- La biota de vida silvestre de la litosfera especialmente ganado, humanos y plantas contienen más BPCs que el medio (debido a la bioacumulación).
- La acumulación de BPCs en la hidrosfera se debe principalmente a la escorrentía de los campos, descargas directas de BPCs y especialmente la sedimentación desde la atmósfera.
- Se estima que las aguas de los Grandes Lagos, contribuyen al 97 % de la contaminación por BPCs de las aguas en los Estados Unidos, siendo el río Lawrence el de mayor fuerza en movimiento el que contamina el Atlántico norte.
- Se ha estimado que con la reducción de las descargas directas y cuantificando solo lo depositado desde la atmósfera y lo aportado desde los ríos de los Grandes Lagos se aporta del 60 al 80 % de la contaminación del océano Atlántico.
- Otros reservorios acuáticos tales como el río Hudson constituyen serios problemas aportando cerca del 1 % de la contaminación del Atlántico, aún y cuando éste es abastecido por los Apalaches.
- El agua de los océanos, aunque de concentración relativamente baja en comparación con algunos lagos y ciertas áreas costeras, constituye el mayor reservorio de BPCs ambientalmente móvil. La alta concentración de la contaminación en la parte norte de los océanos esta ligeramente correlacionada con el grado de desarrollo industrial.
- A pesar de la baja concentración en las aguas superficiales, los sedimentos de éstas contienen mayor concentración del contaminante y la concentración en la biota es aún mayor.
- Los residuos de BPC de los océanos están en continuo flujo con la atmósfera y los sedimentos.

- Los sedimentos de los océanos y lagos son los últimos depósitos de los BPCs móviles aunque también es posible la re-introducción en otros compartimientos del ambiente.
- La tasa de sedimentación es mucho más rápida en océanos y aguas eutrofizadas de altas latitudes debido a la gran concentración de materia en suspensión presente donde los congéneres de BPCs más clorados se absorben y depositan más fácilmente.

La preocupación inicial acerca de los efectos de los BPCs en la salud y medio ambiente surgió a partir de observaciones de cloracné y lesiones hepáticas detectadas en trabajadores que habían intervenido en su producción. Además de los incidentes de Yusho, Japón y la contaminación del río Hudson en los Estados Unidos.

Existe un considerable volumen de datos sobre el monitoreo de BPCs que evidencian su gran concentración y persistencia en el aire, biota, vías fluviales y sedimentos. Entre sus principales efectos tóxicos, su habilidad de alterar los procesos reproductivos de las diferentes especies y los efectos teratogénicos por exposición prenatal en los mamíferos son los más importantes, ya que pueden mermar una determinada población de organismos; aunado a su bioconcentración y transferencia en la cadena trófica que se inicia con el la contaminación del fitoplancton, peces, aves y ocasionado finalmente su biomagnificación en los mamíferos, problemática ambiental por la cual, es necesario desarrollar mayores esfuerzos de control para evitar el deterioro del medio ambiente, mediante la aplicación de soluciones técnicas aceptables de eliminación de este tipo de contaminantes.

Para llevar a cabo una gestión de BPCs adecuada, es necesario enfatizar sus efectos y realizar un profundo análisis de costo-beneficio con el objetivo de evaluar y mejorar los programas y acciones de restauración de sitios contaminados, propiciando con ello el desarrollo de instalaciones para su tratamiento ya que, aunque actualmente la disponibilidad de tales instalaciones ha mejorado, existen aún deficiencias muy importantes; razón por la cual, es necesario afrontar los costos para evitar la contaminación del medio ambiente.

Capítulo VI.

LEGISLACIÓN

6. LEGISLACIÓN

6.1. REGLAMENTACIÓN DE LA U.S.EPA

Los bifenilos policlorados se encuentran dentro de una posición reglamentaria única. En los Estados Unidos, la Agencia de Protección Ambiental (U.S. EPA. por sus siglas en inglés) en su *informe final del Registro Federal de 1982* concluyó que los BPCs son tóxicos y potencialmente oncogénicos dependiendo del grado de exposición y persistencia en el medio (Forrest, 1987).

Debido a una serie de incidentes producidos con BPCs, se han realizado estudios en todo el mundo lo que ha llevado a los países a legislar prohibiendo su producción, almacenamiento, uso y comercio (Valero, 1989).

Los esfuerzos de control más importantes fueron las decisiones de recomendaciones de restricción, producción y uso realizados en 1973 y 1987 por el consejo de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, por sus siglas en inglés) y adoptada por los estados miembros. En ella, se restringe el uso de los BPCs a "sistemas cerrados", éstos comprenden: transformadores, capacitores, fluidos hidráulicos y fluidos de transferencia de calor en equipos pequeños (Dobson, 1993; Kimbrough, 1989). Además se insta a los estados miembros a proporcionar las condiciones de seguridad adecuadas para la disposición de los BPCs y residuos que los contengan; así como al establecimiento de un sistema de etiquetado común; el desarrollo de medios seguros de transporte de tales materiales y a limitar su exportación. En 1982, la OCDE revisó el estado de avance de la gestión de BPCs en los estados miembros, encontrando que la mayoría de las naciones habían reglamentado limitaciones de uso sin embargo, existían pequeños progresos en el control de exportaciones, transporte y etiquetado (Strachan et. al, 1988).

En respuesta a la directriz de recomendación de limitación del uso de los BPCs de la OCDE, en los Estados Unidos el Congreso solicitó en 1976 a la Acta de Control de Sustancias Tóxicas (ACST) la reglamentación de los BPCs. La ACST en 1976, realizó la primera regulación de los BPCs mediante la sección 6(e) en la que prohibió la fabricación, procesamiento o distribución de BPCs a partir del 1 de enero de 1978, con excepción de los fabricados para uso interno y solicitó a la U.S.EPA promulgar normas que controlaran la eliminación de los BPCs. Estas normas, son aplicables a los BPCs y a los artículos contaminados por BPCs que contengan concentraciones mayores a 50 ppm. Los BPCs tal y como se definen en las normas, incluyen: fluidos dieléctricos de aceite mineral, otros fluidos que contengan entre 50 y 500 ppm; suelos, residuos sólidos contaminados con BPCs y los materiales de dragados y lodos del tratamiento de aguas residuales municipales.

En Mayo de 1977 bajo la autoridad de las Sección 307(a) del Acta de Agua Limpia, la U.S.EPA prohibió las descargas de BPCs en vías fluviales. Con base en esto y debido a la necesidad de legislación basada en informes de investigación el Instituto de Investigación de Fuerza Eléctrica (EPRI, por sus siglas en inglés) se estableció una fuerza de trabajo

interdivisionaria para identificar proyectos potenciales, iniciar solicitudes para recabar fondos, revisar propuestas y coordinar información de y para las industrias y otras partes interesadas.

Actualmente tres divisiones de la EPRI están involucradas en esta fuerza de trabajo: La División de Sistemas Eléctricos que es responsable de la investigación sobre el equipo asociado con los BPCs, incluyendo los sistemas para detectar y reducir los niveles de BPC en los aceites de los transformadores; la División de Análisis, Energía y Medio Ambiente, que realiza estudios y análisis de los riesgos y efectos biológicos de los BPCs y de sus substitutos, y la División de Sistemas de Combustión de Carbón que es responsable del desarrollo de las formas para manejar los derrames y disponer de los BPCs concentrados (Forrest, 1987; Kalas, 1990).

Con el apoyo de éstas divisiones, la U.S.EPA emitió en el Código Federal de Regulaciones de 1979 los reglamentos que prohíben el uso de los BPCs en lugares públicos que posteriormente fueron modificados.

En agosto de 1982, la U.S.EPA promulgó un conjunto de reglas finales enmendando los fragmentos de las normas emitidas en mayo de 1979. Estas nuevas reglas permiten el uso de los BPCs a cualquier concentración en ocho diferentes categorías de equipo eléctrico, sujeto a ciertas restricciones de uso y de servicio; las restricciones específicas varían para las diferentes categorías de equipo eléctrico, basándose en la operación del equipo, en los riesgos expuestos asociados con el equipo y la concentración de BPCs en el equipo (Code, 1990; Federal, 1984). Entre los puntos más importantes de comparación de la reglamentación de la U.S.EPA para los BPCs de Agosto de 1982 y Mayo de 1979 se encuentran:

- Se prohíbe el uso después del primero de octubre de 1985 de equipos y transformadores conteniendo BPCs a concentraciones mayores de 500 ppm, que planteen un riesgo expuesto a los alimentos o a los artículos relacionados con los alimentos; y requiere de una inspección semanal de dicho equipo en busca de fugas del fluido dieléctrico hasta la fecha, (la regla propuesta en 1979, había autorizado el uso de este equipo indefinidamente, con el requisito único de inspecciones semanales).
- Se autoriza el uso de transformadores conteniendo BPCs por el resto de sus vidas útiles, y requiere de una inspección trimestral de estos equipos en busca de fugas del fluido dieléctrico.
- Se autoriza el uso de condensadores grandes con BPCs que estén localizados en subestaciones eléctricas de acceso restringido por el resto de sus vidas útiles, (la norma de 1979, había autorizado el uso de este equipo por diez años).
- Se prohíbe el uso de todos los demás condensadores grandes conteniendo BPCs (más de 500 ppm.) después del 1 de octubre de 1988 (la norma de 1979 había autorizado el uso de este equipo por diez años).
- Se eliminan los requisitos de inspección propuestos en 1979 para todos los condensadores grandes, conteniendo BPCs.
- Se autoriza el uso de todo equipo eléctrico conteniendo BPC y los llenados con aceite mineral por el resto de su vida útil.
- Se aclara la definición de lo que constituye equipo eléctrico que establece un riesgo expuesto a los alimentos o a los artículos relacionados con los alimentos.
- Se permite el almacenamiento para la disposición de desechos de condensadores grandes de alto voltaje, que no tengan fugas de BPC y de equipo eléctrico contaminado con BPC afuera

de las instalaciones de almacenamiento, calificado después del 1 de enero de 1983 (la norma de 1979 había prohibido este almacenamiento).

- Se requiere que el registro de inspección y el historial de mantenimiento se conserven por al menos tres años después de la disposición de los transformadores conteniendo BPC (la norma de 1979 había requerido la retención de los registros por cinco años).

Aunado a esto, el Acta de Control de Sustancias Tóxicas, desarrolló un sistema de etiquetado del producto y materiales que los contengan para alertar a la población de la presencia de BPCs en los equipos, para permitir a su vez la preparación del inventario de BPCs. Se publicó, además, el "Manual de BPCs en Equipos Eléctricos" para asegurar el programa voluntario de etiquetado y para proporcionar las guías para el manejo de equipos eléctricos y materiales contaminados con BPCs. Desarrolló también, el plan con formatos de evaluación para el cual organizó seminarios y elaboró guías de procedimientos de inspección para el entrenamiento de personal para realizar inspecciones, monitorear y evaluar las condiciones del equipo contaminado con BPCs (Grant et. al, 1983).

El depósito de BPCs y residuos contaminados (materiales, productos y equipos) en sitios controlados, fue el primer método de disposición para estos compuestos en Norte América hasta mediados de los años 70 (USNRC, 1979) y se estima que del 45 al 50% de la producción de BPCs norteamericana se dispuso en estos sitios (Task Force, 1976; Nisbet et. al, 1972) esta práctica, ocasionalmente ha provocado pequeños incidentes de incendio o bien la generación de lixiviados con los consecuentes problemas de contaminación; sin embargo, no ha existido la información suficiente para determinar y documentar la extensión del problema (Strachan et. al, 1988).

Por ello, la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) determinó que el mayor problema en los estados miembros era la disposición final y dictaminó que el medio más efectivo era la incineración siempre y cuando se mantuvieran las condiciones de 1200 °C de temperatura con tiempos de residencia de al menos 2 segundos con un exceso de oxígeno (20%) en el horno. Sin embargo, como no todos los países miembros poseen hornos adecuados, la OCDE permitió el transporte y exportación para su incineración (Strachan et. al, 1988).

6.2. PERMISOS PARA EL TRATAMIENTO DE BPCs

Las normas sobre BPCs plantean dos tipos de permisos para su eliminación: permisos comerciales y permisos de investigación y desarrollo (I + D) llevada a cabo por organizaciones privadas con fines lucrativos (Giamporcaro, 1991). Los permisos comerciales pueden ser concedidos por la oficina central de la U.S.EPA o por las oficinas regionales. Las indicaciones de éstas normas establecen que los BPCs se pueden eliminar por incineración y confinamiento.

La norma también contiene provisiones que permiten el uso de métodos alternativos de tratamiento que logren un nivel de rendimiento equivalente. Así los tratamientos biológicos deben lograr la reducción de la concentración a niveles inferiores a 2 ppm para cada congénere de BPC; el efecto práctico de esta norma, es que la concentración real de BPCs en una muestra contaminada que se considera eliminada varía en función del número de congéneres presentes en la muestra; por ejemplo si la muestra contaminada contiene solamente un congénere, la

concentración final de BPCs tendría que ser de 2 ppm o menor, sin embargo, si la muestra contiene seis congéneres diferentes, la concentración final de BPCs en la muestra podría ser de 12 ppm; esta flexibilidad posibilita el uso de métodos de eliminación alternativos (CRF40, 1990).

Hasta la fecha, la U.S.EPA ha concedido 38 permisos comerciales para la eliminación de BPCs, 24 de los cuales han sido para métodos de eliminación alternativos, aunque solamente uno de ellos implica la transformación biológica de los BPCs (Giamporcaro, 1997).

Los permisos *I + D* aplicados a menos de 240 kg de material contaminado con BPC, se revisan en el ámbito regional, mientras que aquellos que implican más de 240 kg se revisan en la oficina central de la U.S.EPA; hasta la fecha, se han aprobado 15 permisos que implican métodos de descomposición biológica, de los cuales seis se han aprobado en el ámbito central y nueve en el ámbito regional. El primero de ellos, fue concedido en 1988, utilizando hongos para tratar suelos contaminados; en 1990, se entregaron dos permisos, uno para un estudio *in situ* de los factores que influyen sobre el saneamiento biológico anaerobio de sedimentos de un estanque contaminado y el segundo sobre el tratamiento de suelos y sedimentos contaminados en un reactor biológico a escala piloto. En 1991 se concedieron otros tres permisos, dos para el tratamiento de suelos y sedimentos de ríos contaminados; el tercer proyecto consistía en un estudio sobre la eficacia de combinación de fotólisis y recuperación biológica de suelos contaminados. Todas las investigaciones se han centrado en el uso de microorganismos producidos de forma natural y la aplicación de diversos métodos de transformación biológica (CRF40, 1990).

Aunque la eliminación de BPCs se debe llevar a cabo de acuerdo con un permiso especial bajo la sección 6(e) del Acta de Control de Sustancias Tóxicas, (TASCA, por sus siglas en inglés) las provisiones corregidas en los programas del Acta de Recuperación y Conservación de Recursos (ARCR, por sus siglas en inglés) ha establecido un sistema global para gestionar el almacenamiento y eliminación de residuos sólidos y peligrosos, incluyendo su identificación, con el establecimiento de normas de tratamiento, almacenamiento y eliminación que son aplicables a todos aquellos generadores, transportistas, propietarios y operadores de las instalaciones de tratamiento de residuos peligrosos.

Además, la U.S.EPA, ha creado el Programa de Evaluación de Tecnologías de Innovación del Superfondo, en respuesta a la solicitudes de las Oficinas de Residuos Sólidos, Respuesta a Emergencias y la Oficina de Investigación y Desarrollo para la evaluación de nuevas tecnologías para la limpieza de sitios contaminados con residuos peligrosos, cuyo objetivo es fomentar y proporcionar a la industria nuevas tecnologías de tratamiento viables que puedan presentar ventajas en funcionamiento y costo, en comparación con los métodos de tratamiento tradicionales (Becerril et. al, 1993). Estas técnicas del Superfondo también se tienen en cuenta cuando existe contaminación de BPCs en zonas cubiertas por estos programas (CFR40, 1990).

Los BPCs aparecen en la lista de residuos peligrosos de la RCRA por lo cual, la elección del método de tratamiento de los materiales contaminados con BPCs en una instalación de los programas de ARCR o zona Superfondo está determinada por los procesos de eliminación de los programas respectivos llevados en la zona. El hecho de que un propietario u operador de una instalación de los programas ARCR, o una parte potencialmente responsable en una zona

Superfondo, haya obtenido un permiso *I + D* para utilizar una tecnología en particular con el fin de degradar los materiales contaminados con BPCs, no limita la elección de alguna otra tecnología para la acción correctora, así por ejemplo, las zonas que han recibido permisos *I + D* para BPCs bajo el ACST, pueden estar al mismo tiempo en un proceso de acción correctora conducido por la RCRA (RFC 40, 1990).

6.3.LEGISLACIÓN DE LA COMUNIDAD EUROPEA

Los países comunitarios están sujetos a las normas establecidas por la Comunidad Europea, en la actualidad la mayor parte de los países miembros han adoptado disposiciones que limitan o regulan el empleo de BPC (Martínez, 1988).

Respecto a la legislación comunitaria, la Directiva 75/1439/CEE del 15 de Julio del 75, modificada por la Directiva 87/101/CC fija 50 ppm el límite superior de contenido de BPC/PCT de los aceites usados.

Por otra parte, la Directiva del Consejo 76/403/CEE de las Comunidades Europeas del 6 de abril de 1976 establece que los Estados miembros deberán tomar las medidas necesarias para hacer obligatoria la gestión de los BPCs usados o contenidos en objetos o en aparatos fuera de uso, mediante la adopción de las siguientes medidas:

- ◆ Prohibir la evacuación, el abandono y el depósito incontrolados de los BPCs, así como de los objetos y aparatos que los contengan.
- ◆ Tratar obligatoriamente los BPCs usados o contenidos en los objetos o en aparatos fuera de uso, sin poner en peligro la salud humana y sin perjudicar el medio ambiente.
- ◆ Crear o designar las instalaciones, establecimientos o empresas autorizadas para tratar los BPCs por su propia cuenta y/o por cuenta de terceros.
- ◆ El costo de la gestión de los BPCs, una vez deducida su eventual explotación, deberá ser sufragado por el productor o poseedor que entregue a una instalación o establecimiento de tratamiento.
- ◆ Cada tres años, los Estados miembros informarán a la comisión, en el marco del informe contemplado en el artículo 12 de la Directiva 75/442/CEE, sobre la situación relativa a la gestión de los BPCs en su territorio.
- ◆ A su vez, la Comisión informará cada tres años al Consejo y al Parlamento Europeo sobre la aplicación de la presente directiva (CEE, 1976).

La directiva 76/769/CEE de Julio de 1976, limita la comercialización y uso de sustancias que contenga BPC (excepto mono- y diclorobifenilos) y preparaciones cuyo contenido en BPC sea superior al 0,1% en peso (Martínez, 1988).

La propuesta de directiva del Consejo Europeo XI/201/86-FS relativa a la eliminación de BPCs particulariza para los BPC las normas establecidas en la Directiva 78/319/CEE respecto a los Residuos Tóxicos y Peligrosos. En ella se especifican las condiciones que deben cumplir los aparatos u objetos que contengan o hayan contenido BPCs para ser reutilizados:

- Deberán ser descontaminados por una empresa autorizada.
- Los BPCs deberán haber sido sustituidos por un líquido compatible con las condiciones de utilización del equipo y con las reglas de seguridad correspondientes.

- El equipo deberá tener una etiqueta indeleble y manifiesta.

La propuesta de directiva presentada por el Consejo Europeo relativa a la eliminación del BPC XI/71/87.ES, insta a los Estados miembros a tomar las medidas necesarias para prohibir la mezcla de los residuos que contengan BPCs con otros residuos o sustancias con carácter previo a la entrega una empresa de eliminación autorizada. Además, describe las condiciones mínimas que debe cumplir toda empresa autorizada para la eliminación de BPC así como los requisitos para el transporte del BPC usado y de los equipos que los contengan. En esta misma propuesta se estudia la posibilidad de que cada país miembro realice un inventario con todos los objetos que contengan BPC (Martínez, 1988).

El Consejo de la CEE, se muestra reacio al rellenado (reutilización de equipos contenedores de BPC, debido a que plantea graves problemas (técnicos y ambientales) y ser antieconómico en la mayoría de los casos. También regula el marcaje y etiquetado de los equipos y recipientes que contengan BPC, incluyendo los materiales contaminados con éstos.

La propuesta de la Directiva COM(88)559 final, tras pasar por el Parlamento Europeo, y según se publica en el diario de la Comunidad Europea del 17 de mayo de 1990, aconseja que al definir los BPCs se reduzca dicho límite a 20 ppm para todas las mezclas, incluyendo los aceites usados. Este punto queda de nuevo plasmado, junto con otros de interés, en la propuesta modificada 91/299/05.

Acerca del control de los traslados transfronterizos se considera el convenio de Basilea y la Directiva del Consejo 84/631/CEE y el reglamento del Consejo CEE No. 259/93 del 1 de febrero de 1993 sobre la prohibición de traslados entro los propios países y a países del tercer mundo; y en un caso muy especial se permite sólo en para su tratamiento.

En respuesta a la directriz de la Comunidad Europea, las medidas que han adoptado algunos países miembros de la CEE en relación con los BPCs:

En Alemania, los residuos de BPC se tratan desde 1976 por la Legislación como "residuos especiales" y su uso está limitado desde 1978 a los sistemas cerrados, debiendo ser incinerados a una temperatura mínima de 1,200 °C con un gasto de 0,1 kg/h y una cantidad máxima de BPC en los gases residuales de 20 mg/m³. Para ello, existen cuatro instalaciones autorizadas para eliminar los residuos de BPC, así como, un almacén subterráneo (Martínez, 1988)

En Bélgica, está prohibida toda venta de equipos o aparatos que contengan BPC, sin embargo los ya instalados antes de julio de 1986 están autorizados hasta la fecha de su eliminación o hasta el fin de su vida útil, excepto los situados en instalaciones destinadas a alimentación o preparación de productos farmacéuticos o veterinarios. Es obligatorio la declaración de todos los propietarios de BPC y de los productos, aparatos, instalaciones o fluidos que los contengan, a fin de realizar un inventario, en virtud del Real Decreto del 9 de Julio de 1986. En la gestión de BPC, la adquisición de estos residuos y las instalaciones para su destrucción, neutralización o eliminación de equipos o aparatos que los contengan, debe realizarse sólo por los centros o personas debidamente autorizadas, con la declaración previa a la administración correspondiente. En la práctica, no existe ninguna instalación de eliminación de BPC, por lo que los residuos se exportan a Alemania. La incineración en buques está prohibida.

En Dinamarca los productores de los residuos deben enviarlos a las autoridades competentes para su gestión, no obstante pueden obtener de la misma autoridad un permiso para eliminarlos. En la práctica los residuos contaminados con pequeñas cantidades de BPC se incineran en Nyborg por la empresa Kommunikemi, mientras el resto se exporta a Bayer en Alemania para su incineración (Martínez, 1988).

En Francia, se permite la utilización en sistemas eléctricos cerrados, condensadores que contengan menos de 1 kg de BPC, fluidos dieléctricos excepto en las instalaciones de producción de alimentos, usos experimentales y técnicos sin riegos para el medio ambiente y están reguladas en el Decreto del 26 de Julio de 1975. Si la eliminación es por incineración se realiza en el propio país (Martínez, 1988).

En Holanda el Real Decreto de 1979, define los residuos de BPCs como aquellos que poseen más de 50 mg/kg en residuos no líquidos y más de 0,05 mg/kg en líquidos. Es de destacar el hecho de que los condensadores menores de 1 kg no se consideran "residuos químicos"; La legislación holandesa no establece restricciones en el uso y comercialización de BPCs en intercambiadores de calor y equipos hidráulicos específicos. La vía de eliminación recomendada por las autoridades es la exportación a Francia para su incineración (Martínez, 1988).

En Italia, la legislación incluye a los BPCs dentro del régimen específico de los Residuos Tóxicos y Peligrosos y los considera como tales cuando sobrepasan la concentración límite de 500 mg/kg en virtud del Decreto del 27 de Julio de 1984 (Martínez, 1988).

En Inglaterra, el Ministerio de Medio Ambiente ha dispuesto que, sin excepción, todos los residuos de BPCs de origen comercial o industrial se eliminan en incineradores, registrados en la Administración y deberán estar aprobados por el servicio de inspección en materia de contaminación industrial de aire. La legislación inglesa, define como BPCs todo producto que contenga cantidades superiores a 0,1% en peso (Martínez, 1988).

En general, la mayor parte de los países miembros de la CEE han dictado normas referentes al etiquetado, transporte y almacenamiento de residuos con BPCs y la importación de BPCs o productos contaminados con éstos, suele estar prohibida en la mayoría de los países, salvo que se autorice expresamente por las autoridades competentes. También se requiere de autorización para gestionar y eliminar tales residuos por empresas específicas; los países que no poseen instalaciones de eliminación de BPCs los almacenan hasta poder exportarlos o hasta que se implementen plantas de eliminación en el propio país.

6.3.2. LEGISLACIÓN ESPAÑOLA

En España, la Ley Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos (Ley 20/1986 del 14 de mayo) y el Reglamento para su aplicación (Real Decreto 833/1988 del 20 de Junio), establecen el marco legal para el control y la correcta gestión de los bifenilos policlorados y terfenilos policlorados (PCT, por sus siglas en inglés), a fin de prevenir los efectos perjudiciales que

podieran ocasionar a la salud o al ambiente en el marco de la Ley (20/1986) básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos y el Reglamento para su ejecución que establece los siguientes puntos:

- Los objetos que contengan BPCs en cantidad igual o superior a 500 ppm y se destinen al abandono serán considerados residuos tóxicos y peligrosos.
- Queda prohibido, la evacuación, abandono y depósito incontrolado de los BPCs, así como de los objetos y aparatos que los contengan.
- Sólo se autoriza a tratar los BPCs, a aquellos gestores que dispongan de instalaciones de incineración u otras tecnologías que garanticen el 100% su destrucción; con el previo informe de gestión ante la Dirección General del Medio Ambiente del Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo para que éste emita a su vez el informe a la Comisión para cumplir con la directiva 76/403/CEE.
- Sólo se autoriza el reciclaje de los componentes de los equipos que hayan contenido BPCs residuales, siempre y cuando se garantice que el nivel de contaminación de los mismos sea inferior a 50 ppm.
- El costo de la gestión de los BPCs deberá ser sufragado por el poseedor que los entregue al gestor autorizado, o en su caso, por los poseedores anteriores o por el productor de los BPCs o del material que los contenga.
- Se necesitará de la correspondiente autorización y control las instalaciones para recolección y almacenamiento temporal de los BPCs residuales y equipos contaminados cumpliéndose además con las normas vigentes de Seguridad e Higiene del Trabajo. El período de almacenamiento provisional no deberá exceder los seis meses.
- El vaciado, la limpieza y el rellenado de los aparatos deberán realizarse con fluidos que no contengan BPCs y de tal forma que eviten cualquier contaminación del medio ambiente, y cuando éste deje de ser útil, se deberá asegurar que sus componentes no contengan residuos de BPCs con más de 50 ppm, en caso contrario, se deberán eliminar según las disposiciones aplicables a la destrucción de los BPCs (BOE102, 1989).

Posteriormente, la Orden Ministerial del 14 de abril de 1989 sobre gestión de los bifenilos y terfenilos policlorados, establece la normativa específica sobre los productos en cuestión; en ella se menciona que los envases para BPCs deberán de ser impermeables, tener paredes dobles y estar etiquetados, no pudiendo extenderse el período de almacenamiento más allá de los 6 meses previos a su eliminación a través de un gestor autorizado para ello; las estructuras deberán estar cubiertas, para evitar cualquier penetración de las precipitaciones atmosféricas y estarán equipadas con un sistema especial de recogida de todos los líquidos contaminados para evitar su vertido al sistema de alcantarillado sanitario.

En lo que respecta a la manipulación de BPCs o materiales contaminados con estos productos, los datos publicados sobre los niveles aceptables de contaminación superficial indican 1 mg/m² para lugares donde el personal esté potencialmente expuesto durante 8 horas al día y de 60 mg/m² donde el contacto potencial sea relativamente infrecuente. El empleo de equipos de seguridad es fundamental donde pueda preverse el contacto con BPC, este equipo incluye: protección respiratoria, gafas de seguridad, guantes protectores, botas y traje impermeable hechos de materiales resistentes a la penetración de los BPC, como el polietileno o vitón (Cordero, 1995).

Respecto al transporte, es importante hacer referencia a los acuerdos internacionales para la distribución de materiales peligrosos por carreteras y ferrocarriles y también al código de IMDG para el caso del transporte marítimo; se trata de acuerdos internacionales suscritos por España que establecen la norma reguladora correspondiente.

6.4. LEGISLACIÓN MEXICANA

Aunque los bifenilos policlorados nunca fueron manufacturados en México, fueron utilizados en grandes proporciones en la industria. Las estimaciones de inventarios gubernamentales parciales indican que las cantidades de BPCs almacenados están entre los 3,500 y 4,000 Tm; sin embargo existen estimaciones de empresas privadas que mencionan un total de 7,500 a 8,000 Tm, las cuales permanecen acumuladas en almacenes con poca seguridad y sin ningún tratamiento para su confinamiento y/o disposición final, lo cual ha provocado grandes problemas de contaminación al ambiente (Dobson y VanEsch, 1993).

Dentro de las principales fuentes de generación de BPCs usados se encuentran, la Comisión General de Electricidad, la cual, en el pasado utilizó éstos compuestos como fluidos dieléctricos en transformadores y capacitores que han quedado abandonados en almacenes y frecuentemente presentan fugas de BPCs lo que ocasiona contaminación de arroyos, ríos, lagos y mantos freáticos; además, existen otras fuentes tales como las estaciones del Sistema Colectivo Metro y gran variedad de industrias (entre las que destacan las industrias papeleras y petroquímicas) con un alto índice de generación de BPCs (INE, 1995).

Para su tratamiento, en abril de 1988 se realizó el primer esfuerzo significativo para el establecimiento de un incinerador de horno rotatorio desarrollado hasta la fase de prueba al sur de la ciudad de Tijuana, B. C. por la empresa *Teesa Chemical Waste Management* si bien, el proyecto fue considerado factible, se suspendió por razones de "oposición social" de los habitantes de la zona (INE, 1995).

Por otra parte, en agosto de 1995, se exportaron 385 ton de BPCs a la empresa EKOKEM en Finlandia para su incineración con un alto costo, cabe hacer notar que en los altos costos de eliminación hay que añadir los gastos del embarque y fianzas contra accidentes de traslado (INE, 1995).

En México, la política de gestión de residuos desarrollada por el Gobierno Federal han sido elementos decisivos los Artículos 38 y 39 sobre la prioridad absoluta de los procesos que primaban la eliminación de residuos sobre otras opciones; por esto: se prohíbe la disposición final de los bifenilos policlorados o de residuos que los contengan, en confinamientos controlados o en cualquier otro sitio; y la creación de una infraestructura de gestión de BPCs en concordancia con el estado de la tecnología, es decir, estos residuos sólo podrán destruirse de acuerdo con las Normas Técnicas Ecológicas bajo cualquiera de los siguientes métodos: químicos catalíticos (en el caso de residuos con bajas concentraciones) y la incineración, tratándose de residuos que contengan cualquier concentración (INE, 1995).

6.4.1. MARCO REGULATORIO

La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente a través de su Reglamento en materia de Residuos Peligrosos ha emitido las Norma Técnicas Ecológicas para la reglamentación de los residuos peligrosos entre los que se encuentran los BPCs; por otra parte, la Secretaría de Desarrollo Urbano de Ecología, a través de la Gaceta Ecológica Vol. 11 No. 11 (1990), ha emitido el formato de manifestación para empresas generadoras eventuales de residuos de bifenilos policlorados (BPCs), provenientes de equipos eléctricos (SEDUE, 1990).

La Norma Oficial Mexicana ha publicado 17 normas a través del Diario Oficial de la Federación relacionada a este compuesto:

- NOM-52-ECOL/1993, que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente (DO, 22 Octubre 1993).
- NOM-054-ECOL/1993, que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos por la Norma Oficial NOM-052-ECOL/1993 (29 Noviembre 1994).
- NOM-002-SCT2/1994, listado de las sustancias y materiales peligrosos más usualmente transportados. (DO, 30 Octubre 1995)
- NOM--003-SCT2/1994, para el transporte terrestre de materiales y residuos peligrosos. Características de las etiquetas de envases y embalajes destinadas al transporte y materiales de residuos peligrosos (DO, 21 Agosto 1995).
- NOM-004-SCT2/1994, Sistema de identificación de unidades destinadas al transporte terrestre de materiales y residuos peligrosos (DO, 13 Septiembre 1995)
- NOM-005-SCT2/1994, Información de emergencia para el transporte terrestre de sustancias, materiales y residuos peligrosos (Do, 24 Julio 1995).
- NOM-007-SCT2/1994, Marcado de envases y embalajes destinados al transporte de sustancias y residuos peligrosos (DO, 18 Agosto 1995).
- NOM-010-SCT2/1994 Disposiciones de incompatibilidad y segregación, para el almacenamiento y transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos (DO, 25 Septiembre 1995).
- NOM-011-SCT2/1994 Condiciones para el transporte de las sustancias, materiales y residuos peligrosos en cantidades limitadas (DO, 25 Septiembre 1995).
- NOM-012-SCT2/1994 Sobre peso y dimensiones máximas con los que pueden circular los vehículos de autotransporte que transitan en los caminos y puentes de jurisdicción federal (DO, 7 Enero 1997).
- NOM-019-SCT2/1994 Disposiciones generales para la limpieza y control de remanentes de sustancias y residuos peligrosos en las unidades que transportan materiales y residuos peligrosos (DO, 25 Septiembre 1995).
- NOM-023-SCT2/1994 Información técnica que debe contener la placa que portarán los autotanques, recipientes metálicos para granel (RIG) y envases con capacidad mayor a 500 litros que transportan materiales y residuos peligrosos (DO, 25 Septiembre 1995).

- NOM-024-SCT2/1994. Especificaciones para la construcción, así como los métodos de prueba de los envases y embalajes de las sustancias, materiales y residuos peligrosos (DO, Octubre 1995).
- NOM-043-SCT2/1994 Documento de embarque de sustancias, materiales y residuos peligrosos (Do, 23 Octubre 1995).
- NOM-009-STPS/1994 Relativa a las condiciones de seguridad e higiene para el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias corrosivas, irritantes y tóxicas en los centros de trabajo (DO, 13 Junio 1994).
- NOM-010-STPS/1994 Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se produzcan, almacenen o manejen sustancias químicas capaces de generar contaminación en el medio ambiente (DO, 8 Julio 1994).
- NOM-114-STPS/1994 Sistema para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas en los centros de trabajo (DO, 30 Enero 1996).

Según la disposición legal en vigencia hace responsable directa de la limpieza a los propietarios de los fluidos que contengan BPCs en uso o desechados bajo las siguientes fases (Mendoza, 1994):

- Determinar la existencia y cantidad de BPCs en el establecimiento.
- Informar de las evidencias de la existencia de BPCs a SEDESOL (actualmente SEMARNAP).
- Evaluar el peligro potencial de su almacenamiento por medio de la aplicación de estudios de factores de riesgo.
- Elaborar programas de minimización de riesgos.
- Elaborar y aplicar programas que eliminen, poco a poco los BPCs, considerando la vida útil restante del equipo y la planificación financiera necesaria.

El Instituto Nacional de Ecología (1995) ha emitido una guía para el manejo de los bifenilos policlorados, por el alto riesgo que representan, debiéndose tomar las siguientes precauciones para proteger la salud del personal:

- En los sitios en los que el personal puede entrar en contacto directo con los BPCs líquidos deberán utilizar ropa protectora impermeable, botas de hule, casco de seguridad lentes y guantes de seguridad.
- Los BPCs deben bombearse no verterse, a fin de minimizar las salpicaduras y los derrames.
- Se debe inspeccionar todo el equipo para trabajar con los BPCs en especial las bombas y las mangueras, no deben utilizarse para el manejo de otras sustancias, residuos o para cualquier otro propósito.
- Se deben considerar cuidadosamente el tipo de bomba a utilizar para manejar aceites que contengan BPCs de preferencia se deberán utilizar bombas neumáticas o eléctricas a prueba de explosión.
- Los equipos y materiales contaminados con BPCs se deben envolver en plástico (líner) resistente para soportar el movimiento de carga y descarga.
- Cuando los transformadores y capacitores sean de dimensiones pequeñas, estos podrán colocarse dentro de bidones, rellenando los espacios con materiales apropiados para absorber cualquier derrame que se presente.

- Los condensadores y capacitores de gran tamaño deben ser empacados dentro de membranas plásticas (liner) de alta resistencia y sellarse con calor.
- El almacenamiento temporal de BPCs deberá hacerse en sitios que cumplan con las características para el almacenamiento de residuos peligrosos conforme al artículo 8 fracción VII y de los puntos 14 11 21 del reglamento en materia de residuos peligrosos.
- El lugar de almacenamiento temporal deberá ser un lugar aislado con muros de contención, que no se encuentre expuesto al tránsito, con ventilación, fosas de captación y piso impermeable.
- El almacenamiento temporal de BPCs debe realizarse en tambores de 200 L. En perfecto estado con recubrimiento fenólico en su interior, pintados y debidamente etiquetados con las instrucciones de peligrosidad. No se podrán apilar más de dos tambores.
- Cuando se trate de materiales sólidos contaminados con BPCs, si su tamaño lo permite deberán almacenarse de la misma manera que los líquidos.

6.4.2. TRANSPORTE DE BPCs

Para el transporte de BPCs al lugar de tratamiento, el transportista deberá contar con el permiso de la Secretaría de Comunicaciones y Transportes especial para bifenilos policlorados y autorización del INE para manejo de BPCs, además el personal deberá haber aprobado el programa de capacitación de manejo de BPCs, y se deberá presentar el plan de respuestas a emergencias en caso de derrame o incendio accidental y contra daños al ambiente; se deberá contar además, con planes de contingencia para hacer frente a cualquier accidente eventual.

El transporte debe contar con sistemas de intercomunicación y nunca deben salir dos camiones en forma simultánea, debe existir una diferencia de tres horas como mínimo entre un embarque y otro. Será necesario, además de los documentos ordinarios de transporte, una relación detallada de sus movimientos desde el punto de partida hasta el de almacenamiento o eliminación (Martínez, 1988).

6.4.3. TRANSVASADO DE BPCs

Debido a la existencia de pequeños poseedores de BPCs y al alto riesgo de transportar bidones y recipientes de diversas dimensiones, se deberá llevar a cabo un transvasado de los BPCs líquidos a contenedores especialmente diseñados para este uso, como son los bidones de 200 L o isocontenedores de mayor capacidad, de acuerdo a las normas internacionales.

El transvasado deberá realizarse en circuito cerrado a través de las válvulas de los isocontenedores para evitar salpicaduras y derrames y hasta un máximo de 80 % de su capacidad, al igual que los bidones. Cuando se lleve a cabo un transvasado, el área circundante al proceso deberá estar debidamente protegida con plástico de alta densidad, capaz de evitar su filtración al suelo en caso de salpicaduras o derrames. El proceso de transvasado debe hacerse con mangueras y bombas fijas para evitar cualquier movimiento que provoque un derrame o salpicadura.

6.4.4. EMBARQUE DE BPCs

En el caso de embarque de los BPCs a su destino final, éste deberá realizarse vía marítima. La empresa marítima encargada de su transporte deberá contar con el pago de los seguros correspondientes para el transporte de los BPCs, así como con todas las autorizaciones de los países donde tocará puerto la embarcación en tránsito a su destino final (INE, 1995).

La política de gestión de residuos peligrosos será uno de los campos más importantes del control de la contaminación sobre el medio ambiente durante los años futuros; a nivel internacional, en política de gestión de BPCs desarrollada por los diferentes países, han sido elementos decisivos la generación de leyes específicas a este tipo de compuestos que reglamentan la generación, manejo, almacenamiento, incluyendo el establecimiento de normas aplicables a los generadores, transportistas y a los propietarios y operadores de las instalaciones de tratamiento además de prohibir su traslado a otros países.

En general, entre los países con legislación sobre BPCs existe un cierto consenso en relación a los fundamentos legales de reglamentación, aunque existen diferencias de intensidad y en cuanto a las medidas de control aplicadas; pero la línea de pensamiento básicamente es la misma y ha sido desarrollada en modificaciones de los programas de legislación de los países de la Unión Europea y los Estados Unidos; sin embargo, cada nación tiene la potestad de emitir leyes más estrictas al respecto por ejemplo, el tema de la delegación del control regulador por parte de un país a sus autoridades regionales o locales se encuentra sobre todo en función de consideraciones del tipo de gobierno y capacidad tecnológica de eliminación que posee; Así, en los Estados Unidos el gobierno federal establece la legislación respectiva pero debe delegar su ejecución y puesta en práctica en las autoridades estatales correspondientes; en contraste, en Gran Bretaña existen instituciones encargadas de la concesión de licencias y permisos de instalación y sistemas de control de BPCs bajo la supervisión general del gobierno central; tanto en Japón como en Alemania, la responsabilidad recae principalmente sobre las autoridades regionales; en Dinamarca y Suecia, estos compuestos deben ser trasladados a instalaciones controladas por el gobierno.

En Japón la reglamentación específica las vías de tratamiento y eliminación, mientras que en otros países, estas funciones se dejan como normas de cumplimiento opcional; pero en general, todos los gobiernos establecen un sistema global para la gestión de los BPCs.

Toda esta reglamentación, ha sido dirigida a los equipos que contienen más de 500 ppm de BPC para establecer un nivel de acción de control; esta propuesta reglamentaria fue basada en estudios de beneficio-coste que demostraron que disminuir el nivel de acción a concentraciones menores, incrementaría el costo para las industrias en varios ordenes de magnitud; sin embargo, el costo de los efectos que pueden producirse por la generación de dioxinas debido a una mala incineración que puede potenciar sus efectos dañinos son demasiado altos como para ser ignorados.

En la legislación internacional, se ha aceptado actualmente como vía de eliminación de BPCs la incineración bajo ciertas condiciones de operación de los incineradores; pero permiten además, la aplicación de tecnologías innovadoras de tratamiento alternativo como los tratamientos fisicoquímicos y los tratamientos de biodegradación siempre y cuando demuestren un grado de efectividad aceptable;

Como resultado de esta política, ciertas tecnologías innovadoras para tratar BPCs están siendo sometidas a investigación y se han puesto en marcha numerosos programas administrativos para mejorar y promover su aplicación.

Sin embargo, a pesar de que el sector industrial está respondiendo lentamente al reto de disponer los BPCs que poseen almacenados, lo que ha dado lugar al nacimiento de un conjunto de empresas de tratamiento de BPCs que compiten por ocupar el espacio de comercialización del tratamiento en el aspecto económico, continúan existiendo problemas de financiamiento y se sigue sin cubrir los gastos que de ello se derivan costos a los que los diferentes gobiernos deben hacer frente en pro del mejoramiento de los programas de control.

Capítulo VII.

TRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS

7. TRATAMIENTOS FÍSICOQUÍMICOS

Son muy diversas las tecnologías de tratamientos físicoquímicos de aplicación a BPCs que se pueden utilizar solas o junto con otros procesos; sin embargo, las limitaciones de aplicación sólo a bajas concentraciones y muchas veces, la peligrosidad de los reactivos utilizados restringen su uso, esto unido a los altos costos lo que origina que su uso comercial sea limitado.

La incineración y los depósitos en vertederos controlados son los métodos utilizados con más frecuencia para el tratamiento y disposición de los BPCs y de la mayoría de los residuos orgánicos peligrosos. En los procesos químicos, gran parte de esta tecnología está patentada, por lo que la información referente a la composición de los reactivos utilizados esta restringida.

En general, los tratamientos químicos son procesos en los que se altera la naturaleza de los BPCs por medio de reacciones que en la mayoría de los casos sólo se les atenúa o logra eliminar su peligrosidad. Sin embargo, en ciertas ocasiones los productos resultantes suelen ser aún mucho más tóxicos. Es importante recordar que los procesos químicos no pueden hacer desaparecer los BPCs sino que únicamente pueden transformarlo a otro compuesto por lo tanto, es de vital importancia asegurar que los productos obtenidos en cada etapa de detoxificación puedan ser tratados o dispuestos con mucha mayor facilidad; además, hay que tener en cuenta que los reactivos utilizados en tales reacciones no sean de alta peligrosidad.

Los tratamientos físicos son procesos que por medio de un cambio en la concentración y/o en la fase, transforman a los BPCs en un compuesto más fácil de tratar en un proceso posterior o para su disposición final; sin embargo, no es posible que los métodos físicos presentados compitan favorablemente con los métodos químicos de eliminación a pesar de ser más económicos.

Actualmente las líneas de investigación y desarrollo de tecnologías que se están estudiando son modificaciones de las ya existentes, a fin de perfeccionar las técnicas en si, y las características del producto final, así como hacer al proceso más económico.

Es importante hacer notar, que el gran esfuerzo que se está realizando en los trabajos de investigación en este campo, es muy amplio por la importancia que tienen los efectos de los BPCs en el ambiente y en la salud pública.

Por otro lado, sólo existen tres procesos naturales de transformación de BPCs dispersos en el ambiente: la combustión, la fotólisis que necesita de gran cantidad de luz y períodos intensivos y la biotransformación (Forrest, 1987).

En la naturaleza, la fotólisis es el único proceso químico de transformación de BPCs. El tiempo promedio para la fototransformación atmosférica depende del grado de cloros de la molécula; así por ejemplo, el tiempo promedio para el monoclorobifenilo tiene un rango de 0.62 a 1.4 días mientras que para un pentaclorobifenilo es de 67 días. Debe resaltarse que la volatilización y otros mecanismos de transporte pueden ayudar a la eliminación significativa de BPCs de los diferentes ambientes y así, una vez volatilizado el grado de la transformación fotolítica se incrementa.

7.1. MÉTODOS QUÍMICOS

La mayoría de los métodos químicos dependen de la preparación de un reactivo de sodio para eliminar átomos de cloro de la molécula de BPCs; entre ellos, los más factibles son los que utilizan radicales aniónicos para la decloración de la molécula de BPCs. Estos sistemas se utilizan para la transformación de BPCs en ríos y aceites de transformadores eléctricos contaminados (Alford-Stevens, 1986).

La mayor eficiencia de éstos se obtiene cuando la concentración es baja, entre estos sistemas se encuentran:

7.1.1. DECLORACIÓN CON NAFTENATOS DE SODIO

La técnica se desarrolló en 1978, involucra la preparación de naftenato de sodio en un disolvente con función éter como el tetrahidrofurano (THF) que protege al naftenato de sodio del contacto con el oxígeno y el agua. El extracto seco de BPCs se elimina del mezclado parcial del naftenato y del aceite en una solución de sodio a temperatura constante; para obtener el control efectivo de la reacción se requiere de un buen agitador y un reactor aislado térmicamente para el aprovechamiento de las altas temperaturas producidas.

Los productos de la reacción son el NaCl y un polímero de alto peso molecular conteniendo cloro; para que esta técnica sea efectiva en la extracción de BPCs de matrices acuosas, el compuesto preparado tiene que estar libre de humedad y concentrado, para evitar la reacción violenta entre el agua y el sodio (Mendoza, 1994). *La Compañía Goodyear & Tire*, desarrolló el primer proceso de este tipo a gran escala que utiliza naftenato de sodio el cual reacciona con compuestos orgánicos halogenados, como el clorobenceno; el proceso se aplica a fluidos de transferencia de calor que contiene aproximadamente 120 ppm de BPCs.

La Universidad de Waterloo en combinación con la Asociación Canadiense de Electricidad han realizado trabajos de investigación aplicando el naftenato de sodio para el tratamiento de BPCs en aceites de transformador; los productos de la reacción son: cloruro de sodio, bifenilos y polibifenilos con un rendimiento de alrededor del 99,5 % que se mejora si se recupera el naftaleno con un rendimiento del 60 al 75 %. El inconveniente de este método es la generación de un compuesto inhibidor que afecta el proceso (Alford-Stevens, 1986a).

La Compañía Acurex Waste Technologies (AWT por sus siglas en inglés), utiliza un proceso de sodio similar, pero ha reemplazado los naftenatos en el reactivo anterior con una sustancia similar de patente. El proceso descontamina aceites que posteriormente se filtra y devuelve a los clientes para su reutilización como combustibles de alto poder calórico. El aceite de transformador contaminado con BPC entra al sistema por una sección, donde se cuantifica y filtra; al tiempo que el aceite entra al sistema se agrega el reactivo de sodio y se deja que la mezcla reaccione; hasta que se completa el proceso de destrucción de los BPCs, lo cual se demuestra por el análisis de cromatografía de gases de una muestra. Con este método se logra la reducción hasta de 2 ppm de una concentración inicial de 1,000 ppm de BPCs sin generación de subproductos peligrosos como los policloro dibenzofuranos (PCDF) y policloro dibenzodioxinas

(PCDD); el aceite libre de BPC entonces se filtra y retornado al cliente. La unidad de la AWT es móvil y por lo tanto es capaz de tratar BPCs en donde se necesite, sin embargo el alcance del refinamiento es incierto.

7.1.2. REACCIONES ORGANOMETÁLICAS

Muchos de los sistemas de descontaminación química involucran reacciones organometálicas, basadas en la transferencia de electrones de un metal alcalino como el sodio u otro agente organometálico hasta la molécula de BPCs. Parámetros como el porcentaje de aire y humedad afectan la reacción. Además, las reacciones que se llevan a cabo en la deoloración parcial de productos tóxicos están patentadas y no están disponibles.

En el trabajo de limpieza de BPCs, *La Compañía Sunohio* ha desarrollado un proceso conocido como BPCX. El fluido tratado fluye a través de 4 etapas de filtración, un desgasificador de vacío y finalmente 5 etapas de filtración; el fluido tratado contiene menos de 2 ppm de BPCs. Los productos de la reacción, los reactivos no consumidos y los filtros utilizados se recogen en contenedores, solidificados y dispuestos en vertederos controlados. Este proceso reclasifica transformadores y permite el uso continuo del aceite. El equipo está montado en un remolque de 13 m con un trailer auxiliar. El proceso consta de aparejos que se colocan a lo largo del transformador al cual se le conectan dos mangueras para permitir que el aceite se bombee desde el transformador y después de procesarlos se regresan al mismo, en un proceso continuo. El aceite se bombea desde el transformador o tanque de almacenamiento a través de un calentador hacia una mezcladora donde se adiciona el reactivo; desde allí la mezcla fluye a un reactor y luego hacia un sistema de recuperación que consiste en intercambiadores de calor, filtros, una centrifuga y un evaporador al vacío, antes de regresarlo al transformador o al tanque de almacenamiento ya limpio; las reacciones químicas se llevan a cabo a temperaturas por debajo del punto de inflamación del aceite del transformador y a presiones bajas, suficientes para pasar el aceite a través de los filtros. El proceso requiere de la adición constante de un reactivo inhibidor de oxidación. El inconveniente de utilizar este proceso radica en el alto potencial de explosividad del sodio metálico y las necesidades de seguridad estricta en su manejo (Alford-Stevens, 1986a).

La Compañía General Electric, ha desarrollado un sistema de eliminación de BPCs en aceites de transformadores eléctricos agregando hidróxido de potasio (KOH) y polietilenglicol (PEG). La reacción se realiza a temperaturas moderadas (el Aroclor 1260 reacciona a 60 °C y el Aroclor 1242 a 100 °C). Con este proceso se logra la eliminación completa de los BPCs en concentraciones iniciales de hasta 1 %. (10,000 ppm). La reacción es muy tolerante al aire y humedad; se lleva a cabo utilizando KOH al 85 %; el polietilenglicol utilizado es de calidad comercial; la ventaja del sistema es que contiene agentes organometálicos que no son sensibles a la humedad y al aire.

La reacción es muy simple, sólo se mezclan el polietilenglicol comercial, hidróxido de potasio y el aceite contaminado por 2 horas a 100 °C; después de enfriarse y lavarse con agua o filtrarse, la fase de glicol se separa del aceite de transformador, la presencia o ausencia de oxígeno no tiene efecto alguno en el rendimiento de la reacción. Sin embargo, para mantener la

estabilidad oxidativa del aceite del transformador se recomienda llevar a cabo la reacción bajo una atmósfera inerte de nitrógeno o argón (General Electric Co., 1988).

La Corporación PPM, ha desarrollado un proceso móvil el cual puede eliminar los BPCs del aceite. La unidad móvil utiliza los aceites contaminados con mezclas de BPCs (hasta 2000 ppm de BPCs) destruyéndolos químicamente y produciendo un aceite reutilizable, una solución acuosa y pequeñas cantidades de sólidos (Superfondo U.S.EPA).

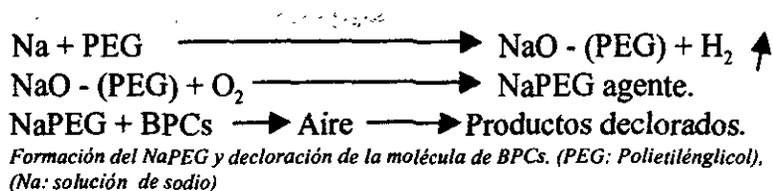
7.1.3. EMPLEO DE POLIETILÉNGLICOLATOS DE SODIO

La aplicación de sistemas de deoloración con sodio es factible ya que los aceites se recuperan para su reutilización, pero estos métodos son costosos, además de su peligrosidad por el alto grado de explosividad del sodio metálico. *El Centro de Investigación Franklin (FRC, por sus siglas en inglés)*, tiene un proceso conocido como NaPEG que utiliza polietilenglicolatos de sodio observándose una deshalogenación cuantitativa de los compuestos organohalogenados, incluyendo los BPCs para producir halúros de sodio y derivados orgánicos no peligrosos. En este proceso, el reactivo NaPEG reacciona con los BPCs del fluido dieléctrico en el aceite mineral a 100-125 °C para formar cloruro de sodio y una variedad de productos solubles en agua y biodegradables, además de compuestos aromáticos oxigenados.

El calor continuo deolora los BPCs extraídos antes del procesamiento; el aceite contaminado se filtra para eliminar el agua y los sólidos libres, posteriormente se bombea hacia el tanque del reactor donde se agita y se calienta; el reactivo NaPEG se agrega a 80 °C en una cantidad que depende de la concentración de BPCs y de los otros contaminantes clorados en el aceite, la mezcla se calienta a 120 °C y se mantiene hasta que la muestra registre un cero de BPCs, definido como menor a 2 ppm; se deja que la mezcla se enfríe y en ese punto se separa por gravedad en dos fases, la fase de aceite se bombea a un tanque separador donde se lleva a cabo una separación adicional.

El residuo, principalmente el reactivo utilizado, se bombea a un reactor de postratamiento para su oxidación después del análisis para verificar que no existan BPCs ni otros compuestos tóxicos, el reactivo se puede procesar para su reutilización o bien se diluye y desecha (esta práctica ha sido prohibida en algunos países con legislación al respecto). El aceite limpio se circula a través de un filtro para retirar las trazas del reactivo, se analiza y se bombea al tanque de almacenamiento de aceite limpio para su reutilización como fluido dieléctrico de transformador (Forrest, 1987).

Este sistema es de gran interés comercial por varias razones: 1) es un proceso químico para destruir los BPCs que ofrece la posibilidad de que el aceite descontaminado puede ser utilizado y 2) la oportunidad de tener el reactivo preparado de la FRC es preferible a trabajar con sodio; el aceite tratado es de color rosa, lo que indica la posible presencia de compuestos quinoleicos, producidos en la reacción con el inhibidor de oxidación, otros productos son NaCl y polihidroxibifenilos (Superfondo U.S.EPA).



La Compañía Niagara Mohawk Power ha desarrollado un método que involucra una mezcla de KOH, PEG y dimetilsulfóxido; en el cual se mezclan los BPCs directamente con los reactivos hidroxiglicol agregando dimetilsulfóxido para incrementar el tiempo de reacción, la de cloración del bifenilo se realiza rápidamente hasta una concentración de 2 ppm. Las condiciones de operación son 150°C, 403.2X10⁶ cal/h con seis radiadores de aire de enfriamiento en serie, para una mezcla de 8316 L dentro de un reactor discontinuo por un tiempo menor a 2 horas, el proceso de la de cloración no es peligroso y permite la reutilización del aceite contenido en el transformador además de ser más económico que la de cloración con sodio metálico y la incineración.

7.1.4. OTROS MÉTODOS DE DESTOXIFICACIÓN QUÍMICA

La aplicación de estos métodos es principalmente para la eliminación de compuestos tóxicos como los policloro dibenzodioxinas, compuestos aromáticos clorados y BPCs. La reacción utiliza un alcoholato de metal alcalino de cadena corta como los glicoles de alcanos o polihidroxialcanos con hidróxido de un metal alcalino; el proceso se realiza entre los 140°C a 220°C a presión atmosférica; cuando se utiliza un etilenglicolato de sodio, los productos de la reacción son el hidróxido del metal alcalino con el glicol en solución acuosa y un alcoholato de metal alcalino (Alford-Stevens, 1986b).

La compañía Ontario Hydro desarrolló un proceso B.C. de hidrode cloración de BPCs que utiliza un metal alcalino como el sodio en dispersión directa dentro del aceite contaminado, la velocidad de reacción es sensible al tamaño de partícula en la dispersión y la temperatura, así como la presencia de un inhibidor oxidante, una desventaja es la utilización de metales alcalinos (muy reactivos).

La Secretaría de Marina de EU de América, tiene un proceso de dos pasos para la detoxificación química de BPCs, convirtiéndolos en sustancias biodegradables inocuas, sin generar subproductos tóxicos u otros contaminantes; el proceso comprende (Secretary of Navy, 1989):

a).- La reducción de los BPCs en un rango de temperatura de 25°C a 80°C con un agente reductor selectivo como NaBH₄, KBH₄, LiBH₄, Ca(BH₄)₂, o Sr(BH₄)₂, que pueden utilizarse con seguridad en agua o sistemas de agua-alcohol, y producen un bifenilo insustituible.

b).- En el segundo paso, se lleva a cabo la oxidación del bifenilo insustituible, en agua o solución agua-alcohol a un rango de temperatura de 25°C a 80 °C, utilizando un agente oxidante selectivo como persulfato de sodio o potasio, perborato de sodio o potasio o cualquier permanganato de un metal alcalino o alcalino-térreo los cuales, producen bióxido manganeso

(excepto los permanganatos de bario y radio) y un ácido dicarboxílico biodegradable (Sofer, 1986).

La Compañía American Toxic Disposal Partners, tiene un aparato para tratar el material sólido fluidizable contaminado con compuestos orgánicos tóxicos, con puntos de ebullición de 100 °C; el sistema comprende el calentamiento y fluidización de sólidos en un vaso de secado a una temperatura suficiente para facilitar la recuperación de los contaminantes orgánicos tóxicos en una corriente de gas de salida, dejando sólo 5 ppm de los contaminantes del sólido fluidizable, removiendo los gases contaminados del sistema (Electric Power Research Ins, 1988).

La Compañía American Colloids tiene un método similar pero específico para BPCs (American Colloids Co., 1988).

La Compañía Westinghouse Electric posee un equipo para transformar los BPCs residuales de los transformadores, el método comprende: el paso de vapor de agua a través del aparato para formar una mezcla azeotrópica con los BPCs, aplicando vacío para evaporar los azeótropos y enfriándolos para hacerlos líquidos (Westinghouse Electric co., 1987).

La Corporación Quadrex HPS tiene un equipo para eliminar los BPCs de los equipos eléctricos cuyo principio es el retrolleado del aparato eléctrico con fluido dieléctrico en estado líquido. En este, los BPCs son disueltos para formar una solución que se transfiere a un medio donde se separan los BPCs del fluido dieléctrico para reutilizarse nuevamente. De este modo, se proporciona el aislamiento durante la operación del aparato. Este sistema elimina los BPCs residuales siempre y cuando no excedan las 50 ppm (Quadrex HPS Inc, 1987).

El Departamento de Tecnología Avanzada en Refinería del Petróleo de EUA, tiene un proceso para la transformación de BPCs en un medio líquido no acuoso, mediante el contacto de éste en condiciones anhidras con un haluro metálico y un ácido de Lewis en presencia de un hidróxido en solución alcohólica; el metal del hidróxido se combina con el cloro para formar un precipitado sólido en un medio no acuoso a elevada temperatura, eliminándose así el cloro de los BPCs en un precipitado en forma de sal (Advance Refinery Technology, 1990).

La Corporación Transformer Service en EUA, tiene un proceso para la deshalogenación de BPCs. El proceso comprende el contacto y reacción de los BPCs con una base fuerte y un compuesto de azufre en un rango de temperatura de reacción de 65 °C a 100°C. La cantidad de bases fuertes y compuestos de azufre necesarios son de 10 a 100 equivalentes para cada átomo de halógeno en los BPCs.

Los compuestos de azufre seleccionados para la reacción son: los dimetilsulfóxidos, tetrametilsulfóxido, dimetilsulfona, sulfonatos y compuestos similares; las bases fuertes utilizadas, son los hidróxidos de sodio, litio, t-butóxido de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amida de potasio además de sodio, butil litio, metillitio, sodio, potasio y litio (Transformer Service Inc, 1990).

El Departamento de Energía Eléctrica de EUA, posee un método para la eliminación de BPCs de equipos eléctricos por extracción con solventes. El equipo utilizado cuenta con una zona

de extracción-destilación múltiple con una sección de eliminación y alimentación de los aceites contaminados con BPCs donde se lleva a cabo la separación con solventes selectivos para BPCs.

La separación parcial del solvente, se produce por extracción y destilación hasta producir un residuo que contiene del 20 al 80 % del solvente mediante su separación del residuo de fondo por enfriamiento, formándose dos fases: una de solvente y otra de aceite/BPC la cual se vuelve a reciclar en el sistema para incrementar la concentración de BPCs en la zona de extracción, minimizando así la pérdida de aceite y obteniendo un residuo de BPCs concentrado para depositarlo en un vertedero controlado (Electric Power Research Ins, 1988).

7.1.5. RELLENADO DE TRANSFORMADORES

Las unidades que contienen Askarel® también se pueden descontaminar por un proceso de rellenado; sin embargo, disminuir a 50 ppm el contenido de BPCs es una tarea muy difícil, ya que originariamente los transformadores Askarel® contienen 60-70 % de BPCs puro (Forrest, 1987).

La Compañía Dow Corning utiliza el sistema Retrosil que incluye la inspección del transformador para asegurar que esté en buenas condiciones de operación; en ello, se incluye la eliminación y la disposición adecuada del líquido BPC, la purga de la unidad, el rellenado del transformador con un líquido dieléctrico de silicona y el procesamiento del nuevo líquido a través de un equipo con adsorbentes para retirar los BPCs. Esta operación, se efectúa en una estación de control que registra y controla el proceso de adsorción; éste consiste en una bomba, un medidor de tiempo, sensores de flujo, sensores de nivel y varias características de seguridad integradas para proteger el transformador y el medio ambiente. La unidad adsorbadora (del tamaño de un tambor), está montada dentro de la estación de control y conectada por mangueras y válvulas al transformador. El fluido circula continuamente mientras que el transformador está en funcionamiento. Generalmente se requieren de varias unidades adsorbadoras desechables.

Sin embargo, el simple rellenado no soluciona el problema debido a que los BPCs residuales migran desde el núcleo, los recodos y el aislante del transformador para contaminar el nuevo aceite (Análisis Itesm., 1985).

7.1.6. SUSTITUCIÓN DE FLUIDOS DIELECTRICOS

Existen dos nuevas categorías de fluidos para transformador para utilizarlas como un sustituto del fluido Askarel®: (1) Los llamados del grupo "menos inflamables" como siliconas e hidrocarburos parafínicos; y (2) los del grupo "no inflamables" como los tetracloroetilenos. Mientras que las siliconas y parafinas han sido utilizados desde hace mucho tiempo por varios fabricantes, los tetracloroetilenos se han desarrollado recientemente.

Los fluidos basados en hidrocarburos parafínicos biodegradables, no bioacumulables y no tóxicos cumplen los requisitos del *Código Nacional de Electricidad (NEC) de USA*, que proporcionan los reglamentos de la industria para cumplir las medidas de protección requeridas.

El fluido de silicona para transformadores es un líquido hidrófobo, transparente, no aceitoso, estable químicamente, inerte, inodoro y estable térmicamente; los informes

bibliográficos indican que no son tóxicos; sin embargo, en condiciones de calentamiento y enfriamiento tienden a formar geles que bloquean la circulación y pueden llegar a ser peligrosos (Análisis Itesm., 1985).

Recientemente se han desarrollado técnicas de marcaje con Cl^{37} en bifenilos tetraclorados, detectados fácilmente por análisis cromatográfico; su determinación por espectrometría de masas en el rango de iones correspondiente de Cl_{37}/Cl_{35} , permite la dechloración sucesiva de los BPCs en el impactador de electrones positivos (EI) lo cual, permite la dechloración de los iones Cl_{35} marcados. Los cloros en posiciones *meta* y *para* son los más fácilmente eliminados, en comparación a los de posición *orto*; la primera reacción de dechloración es totalmente estereoselectiva para los isómeros de BPCs (Bush y Lo, 1973; Diunker y Buchertall, 1988 y 1989).

7.1.7. DESCOMPOSICIÓN NUCLEOFÍLICA

La descomposición nucleofílica es otro método que se ha utilizado para descomponer los BPCs con base en el desplazamiento nucleofílico repetitivo de un cloro por un anión tiolato o un grupo hidroxilo; el producto de esta reacción es un polihidroxibifenilo; la gran desventaja del proceso, es su alto costo (Mendoza, 1994).

7.1.8. CLORÓLISIS

La clorólisis en residuos de hidrocarburos clorados ha sido utilizada por la compañía *Hoechst A. G.* El proceso involucra la reacción del gas cloro a presiones hasta de 25 MPa y temperaturas de 640°C obteniéndose tetracloruro de carbono y ácido clorhídrico como residuos. La reacción tiene como condición necesaria para tratar los BPCs que estos no estén diluidos, lo que incrementa el tiempo de residencia en el reactor o bien el uso de un catalizador. El CCl_4 y HCl se separan por destilación y los restos de la mezcla se reciclan al reactor.

La clorólisis es una reacción exotérmica lo que reduce el costo del proceso, sin embargo debido a la naturaleza corrosiva de los productos químicos obtenidos y las condiciones extremas de reacción, se necesita la construcción de equipo con níquel de alta pureza, lo que origina un incremento del costo del capital de implementación del equipo (Alford-Stevens, 1986b).

7.1.9. OZONÓLISIS

La ozonólisis desarrollada por el *Colegio Militar y la Universidad de California*, utiliza un exceso de ozono, de 6-8 veces es suficiente para obtener una destrucción de 90 a 95 % de BPCs. El proceso tiene un elevado costo que no es competitivo con la incineración; además, durante el proceso de oxidación se producen policlorodibenzo dioxinas y policlorodibenzo furanos (Alford-Stevens, 1986b).

7.1.10. REDUCCIÓN ELECTROQUÍMICA

La Corporación Envirogenics System ha utilizado con éxito la reducción electroquímica, para la decoloración no acuosa de los BPCs que involucra la formación de radicales aniónicos en la superficie de un electrodo de Hg.

El método conocido como "Potencial Controlado de Electrólisis", produce radicales aniónicos tales como: el antraceno, 9,10-difenilantraceno y etanonitrilo en solución de dimetilformamida (DMF).

Los radicales aniónicos estabilizados reaccionan con las moléculas de BPCs produciendo cloruro en grandes cantidades, de la misma manera que un reactivo organometálico. El bifenilo es el producto final de la reacción (Alford-Stevens, 1986a).

7.2. MÉTODOS FÍSICOS

7.2.1. INCINERACIÓN

Ya que la clave para el éxito de programa de control de BPC de la U.S.EPA esta basada en la disponibilidad de instalaciones adecuadas para los residuos, muchos de los esfuerzos de parte de la U.S.EPA, están dirigidos hacia la aprobación de incineradores y verificación de los quemadores en las calderas de alta eficiencia en la industria. Los residuos del aceite mineral retirado de los transformadores eléctricos que poseen BPCs en forma líquida en concentraciones de 50 a 500 ppm pueden quemarse en incineradores de alta eficiencia que cubran ciertos criterios técnicos establecidos por la U.S.EPA.

Estos incineradores operan con buenas características de combustión y se ha demostrado que logran las altas eficiencias de destrucción de los BPCs sin emisión de subproductos tóxicos debido a la excelente combustión.

Es importante hacer notar que la transformación térmica efectiva de los BPCs requiere de una temperatura controlada con precisión y de un tiempo de residencia adecuado. Los investigadores de la U.S.EPA, han establecido que para la completa destrucción de los BPCs (utilizando mezclas comerciales e isómeros puros) las temperaturas deben de aproximarse a los 1,200 °C con al menos 2 segundos de tiempo de residencia y un exceso de oxígeno en la combustión, (Freestone et. al., 1988).

Los incineradores industriales tipo Horno Rotatorio cubren las especificaciones de la U.S.EPA al 99,99 % de destrucción de los BPCs, aún para los condensadores BPC tipo fragmentado pero, en ocasiones pueden producirse PCDD o PCDF lo cual debe verificarse en el humo de la chimenea (Chang y Sorbo, 1988).

Estos incineradores requieren de una cámara secundaria de material cerámico (resistente al cloruro de hidrógeno) con el diseño adecuado para cumplir con el tiempo de residencia requerido a 1000 +/- 100 °C, con un dispositivo apropiado para captar el HCl del humo en la chimenea.

7.2.2. INCINERACIÓN DE CONDENSADORES BPC

La incineración de condensadores BPC requiere de una instalación mucho más compleja que para la simple incineración de fluido BPC. El condensador BPC estándar es de 60 x 30 x 15 cm cada caja, la cual contiene serpentines de aislamiento de papel envueltos alrededor de marcos con núcleo de madera, todo esto está completamente sumergido en 8 ó 12 L de fluido BPC. La caja, el papel, la madera y los BPCs deberán ser completamente incinerados en un horno rotatorio y de ahí pasar a una cámara de combustión retardada; el quemador retardado consume el 99,99 % de los BPCs y las cenizas se disponen en un vertedero controlado aprobado por la U.S.EPA (Federal, 1984).

Los líquidos antes de ser incinerados, son analizados para determinar su poder calorífico, cantidad de ácido generado debido a los hidrocarburos halogenados, contenido de ceniza residual y de azufre; los residuos del líquido son luego mezclados a una temperatura de combustión lo suficientemente alta para cubrir las condiciones de destrucción requerida durante la incineración.

Los líquidos y gases son incinerados en la cámara secundaria de combustión junto con los gases del incinerador rotatorio; los gases calientes que salen de la cámara de combustión secundaria pasan a una torre de lavado donde se retiran las partículas y los gases ácidos; los afluentes gaseosos, con alta concentración ácida se neutralizan en un extractor usando sosa cáustica y una pasta líquida de cal; de la pasta líquida extraída se separa una fase líquida que se inyecta a un pozo profundo.

Los fluidos residuales con concentraciones de BPC superiores a 25,000 ppm de acuerdo a la U.S.EPA, no deben quemarse en la cámara de combustión secundaria (Freestone et. al., 1988).

La Corporación Environmental International posee una instalación aprobada por la U.S.EPA que primero fragmenta los condensadores y luego utiliza un proceso de extracción por solvente para separar los fluidos BPC de los materiales sólidos. Posteriormente, los sólidos se reciclan para uso industrial y los líquidos BPC se almacenan en un tanque en espera de su incineración o su descomposición química en otra instalación.

La Corporación Sed. en Waukesha, esta operando una instalación similar aprobada por la U.S.EPA de extracción/fragmentación mecánica líquido-líquido en Greensboro, NC. (Freestone et. al., 1988; Análisis Itesm., 1985).

7.2.3. HORNOS DE INCINERACIÓN

La Compañía de Cementos St. Lawrence posee hornos para hacer cemento que también se adaptan para la destrucción de los BPCs. En esta operación, la reacción del óxido de calcio del cemento con el cloro de los BPCs produce cloruro de calcio. Con estos hornos operando a temperaturas de 1,500°C el producto del cemento no contiene contaminantes de BPCs. El inconveniente de este sistema, es la existencia de fugas por imperfecciones del sello mecánico.

El Consejo de Investigación de Aire de California, el Departamento de Servicios de Salud de California y la U.S.EPA, han implementado un incinerador de lecho fluidizado para la

eliminación de residuos peligrosos, el sistema consiste básicamente en una cámara de combustión primaria y secundaria en el cual el lecho de combustión principal se lleva hasta la parte superior y se colecta, por un ciclón y continuamente se recircula hacia el fondo de la cámara de combustión mientras que el lecho de sólidos se mantiene estacionado. La operación de recirculación ofrece la posibilidad de tener un mayor rango de mezcla y volteo permitiendo la uniformidad en la temperatura en comparación a la cámara de combustión convencional; un ventilador proporciona aire a las cámaras de combustión mientras que los gases de la cámara, se enfrían mediante un intercambiador de calor. Este incinerador opera a bajas temperaturas para prevenir la formación de escorias en el lecho, con una baja concentración de NOx. La oxidación completa del combustible se mejora con la mezcla de los sólidos del lecho con exceso de oxígeno y un tiempo de residencia adecuado para la recirculación de sólidos.

La presencia de un reactivo en el lecho de sólidos permite la captura de halógenos y compuestos de azufre los cuales se eliminan en un rango de 88 a 90 % y una alta eficiencia de destrucción de residuos peligrosos (Vander et. al., 1992; Chang y Sorbo, 1988).

La incineración de material en el mar, aprobado por la U.S.EPA en el pasado se realizó con éxito; *La Compañía Oceanic Combustión Services* (subsidiaria de la *Corporación Chemical Waste Management*) posee los *Vulcanus I y II*, barcos incineradores que navegaban en aguas del Atlántico; estos atracaban en Mobile, Le Havre (Francia) y Santander (España) donde esta compañía tenía sus instalaciones de transferencia de residuos y almacenamiento. La desventaja de éste método fue la dispersión en el mar de los residuos ácidos después de la incineración, por lo cual se prohibió (Valero, 1989).

La incineración es un tratamiento y método de disposición relativamente caro, debido a la dificultad para someter los BPCs a una combustión eficaz. Los precios dependen del estado en que se reciba, en tambores o a granel, el contenido de ceniza y otros factores (Freestone et. al., 1988).

Tanto los hornos en tierra como los incineradores en el océano plantean una gran desventaja en tiempos, costos y riesgos de accidente por el transporte de material con BPCs hacia el lugar donde se incineran; para eliminar esta desventaja la *Compañía Pyromagnetics*, opera un incinerador de alta temperatura montado en un camión aprobado por la U.S.EPA, para fluidos con menos de 50 % de BPCs (Freestone et. al., 1988; Federal, 1984).

Las Compañías Rollins, Ensco y CWMI, brindan servicio de transporte e incineración de BPCs a sus clientes. La flota de transporte desarrollada para este servicio abarca una amplia variedad de vehículos y equipos especializados, incluyendo camiones recubiertos de acero inoxidable, de hule o de epoxi, trailer al vacío para remover el desperdicio de los tanques contenedores, tractores y plataformas para los barriles y los tambores. Los conductores y los cargadores están altamente capacitados para manejar estos residuos peligrosos.

7.3. MÉTODOS DE TRATAMIENTO ALTERNOS

Además de los métodos ya aprobados por la U.S.EPA, un gran número de investigadores ha buscado nuevas opciones para la disposición de los BPCs utilizando una amplia variedad de técnicas incluyendo los métodos de destrucción física-vacío, espumas, filtración y la sal fundida (Budiansaky y Josephson, 1980; Kutz, 1976).

7.3.1. TECNOLOGÍA DE ARCO DE PLASMA

La Corporación Pyrolysis System ha desarrollado un sistema de arco de plasma móvil para la destrucción de los BPCs. El proceso de pirólisis de destrucción utiliza acetato de metilo y metanol y produce un gas-ácido, un gas combustible y carbón; el gas-ácido se remueve en un lavador cáustico el cual captura también la mayor parte del carbón, y el gas combustible se incinera. El sistema tiene un rango de alimentación de BPCs de 200 L/h con un 99.99% de eficiencia de destrucción.

El proceso de arco de plasma está basado sobre el concepto de pirólisis de las moléculas de los BPCs utilizando un campo de plasma térmico; el arco eléctrico se produce por un conjunto de electrodos colineales; la presión de aire seco es el medio a través del cual pasa la corriente eléctrica y como resultado de la intensa energía, el aire del ambiente se ioniza hasta formar un plasma a temperaturas cercanas a los 10,000 °C. Los BPCs se inyectan dentro del plasma fraccionándose a su estado atómico en una atmósfera carente de oxígeno, formándose hidrógeno, cloruro de hidrógeno, monóxido de carbono y partículas de carbón en mayor cantidad además de dióxido de carbono, acetileno y eteno en pequeñas cantidades; los gases que se producen se someten a un proceso de lava para eliminar el HCl (Kolak et. al., 1988).

7.3.2. EXTRACCIÓN

La tecnología de extracción líquido-líquido con isopropanol se utiliza para la rehabilitación y disposición de las aguas de ríos contaminados con BPCs, incluso en aceites de transformadores utilizando Furfural como disolvente de los bifenilos, el proceso se realiza separando una pequeña cantidad del azeótropo en lugar de una gran cantidad de aceite, pero la adsorción en camas empaquetadas es más efectiva (Baker, 1991; Cordero, 1994).

7.3.3. EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA

Se han desarrollado trabajos sobre extracción supercrítica con CO₂ de BPCs. La fluidez del líquido (tiempo de extracción a volumen constante) en la extracción, está en función de las dimensiones del vaso de extracción, el tipo de fase de sorbente, la temperatura y la presión aplicados (200°C y de 150 a 650 atm), por lo cual, es difícil generalizar sobre los resultados obtenidos en cada extracción (Chementator, 1993a).

El uso de fluidos supercríticos tiene gran potencial como método de destrucción de BPCs. Con esta técnica la eficiencia de detoxificación de compuestos orgánicos tóxicos es del 99.9% realizándose en pocos minutos; el proceso inicia cuando la temperatura de un líquido y un gas se encuentran en equilibrio y las densidades de las dos fases llegan a ser indistinguibles, por lo tanto, el "punto crítico" de las dos fases son idénticas y la sustancia puede describirse como un fluido único.

Los residuos orgánicos no polares como los BPCs son solubles en todas estas proporciones y, en presencia de un oxidante como el oxígeno o peróxido de hidrógeno, pueden reaccionar formando agua, dióxido de carbono y ácidos orgánicos de cadena corta.

Su ventaja en comparación con la incineración, es que no emite residuos a la atmósfera pero debido a las necesidades extremas de temperatura y presión del sistema, el proceso tiene un lento desarrollo de implementación debido principalmente a su elevado costo (Vander et. al., 1992; Mendoza, 1994).

7.3.4. DESTILACIÓN

La destilación se usa principalmente para separar los BPCs del aceite del transformador; obteniéndose fracciones de vapor del sistema por destilación de vacío, los BPCs se separan a presión atmosférica y temperatura ambiente evitando su transformación térmica. La dificultad del método radica en la superposición del rango de ebullición de los compuestos (Mendoza, 1994).

7.3.5. OSMOSIS INVERSA

El proceso de ósmosis inversa se utiliza para soluciones acuosas a bajas concentraciones de contaminantes, lo que los hace poco atractivo como método de tratamiento (Mendoza, 1994).

7.3.6. ADSORCIÓN

La *Compañía R.T.E.*, desarrolló un sistema que contiene neopreno como medio de absorción, la tasa de reducción de BPCs está gobernada por la recirculación del aceite y por el fenómeno de adsorción/absorción del proceso mismo; la eficiencia global de eliminación depende de la aromaticidad del aceite y los productos de oxidación contenidos en el sistema. Su velocidad de operación es sumamente lenta y por lo tanto es su mayor desventaja.

7.3.7. MATRICES DE AISLAMIENTO

La estabilización comprende aquellas técnicas que reducen el peligro potencial de un residuo mediante el paso de sus elementos contaminados a su forma de menor movilidad, solubilidad o toxicidad. La estabilización no cambia necesariamente su estado físico, la solidificación no implica necesariamente una integración química entre los residuos y los agentes solidificantes, pero supone un enlace mecánico de los residuos dentro de la masa monolítica. La

migración de las sustancias contaminantes se ve reducida por la disminución de la superficie expuesta y/o por el aislamiento de los residuos en el interior de cápsulas impermeables.

La estabilización-solidificación de residuos es sensible al pH (frecuentemente crítico), los residuos pueden ser solidificados utilizando dos tipos de productos, por sorción y agentes de encapsulación. Este proceso se utiliza para lodos aceitosos, residuos obtenidos por filtración y suelos contaminados por BPCs y otros contaminantes tóxicos. El método provee la limpieza para sitios o zonas de entierro y descarga de residuos peligrosos, básicamente la técnica consiste en la combinación del contaminante líquido con una mezcla de cemento y la roca así formada de BPC se deposita en sitios de disposición controlados.

El proceso *Soliditech* desarrollado por las Compañías *Imperial Oil* y *Champion Chemical Superfund*, se utiliza para tratar suelos contaminados con Aroclors® 1242 y 1260; el proceso mezcla el material contaminado con aditivos propios (cemento portland formulado por *Soliditech*) materiales puzolánicos (roca volcánica) y agua, en un reactor que "solidifica" los BPCs de forma homogénea estabilizando el contaminante y disminuyendo la concentración de los mismos; el bloque así formado tiene una gran resistencia a la exposición ambiental y se pueden depositar en sitios de disposición controlados.

La Compañía *ENERCO* experimentó con un proceso de solidificación utilizando carbón activado para la captura de BPCs en los aceites de transformador en los lodos residuales, transportando la masa solidificada a un sitio de disposición controlado, sin embargo, a pesar de la relativa facilidad de estos procesos, su eficacia no es tan satisfactoria para los residuos orgánicos por su alto grado de filtración (Mendoza, 1994).

7.3.8. PROCESO DE GASIFICACIÓN

La Universidad de Columbia bajo la supervisión de la U.S. EPA desarrolló el proceso "*Toxiplex*" para la destrucción de compuestos orgánicos tóxicos muy refractarios como el Askarel®. Este proceso, es una adaptación del proceso de hulla simple de gasificación de biomasa; el contaminante es suministrado directamente dentro de una cámara de combustión parcial con gasificación por medio de oxígeno y vapor con control de temperatura a 1,650°C; regulando el oxígeno de acuerdo a la proporción de vapor, de manera que el balance de la combustión exotérmica parcial del carbón, entre en reacción endotérmica con agua gaseosa.

Los productos de la combustión son óxidos de nitrógeno, metano, ácido clorhídrico y CO₂ que inciden en la incandescencia del lecho de carbón en donde se completa la gasificación. El tiempo de residencia en la cámara de combustión parcial es de 50-1000 milisegundos, mientras que el tiempo de contacto con el carbón incandescente es de 1 ó 2 segundos en un rango de 1650°C a 15900°C dependiendo del gasto másico. La temperatura de llama alta y el subsecuente contacto con el carbón incandescente proporcionan una eficiencia superior al 97% de eliminación de BPCs. Sus principales ventajas son: que evita la contaminación a la atmósfera, no produce tóxicos, polvos o cenizas, evita la contaminación del agua por filtraciones y su desventaja es que no acepta gran variedad de compuestos tóxicos además de su alto costo (Freestone et. al., 1988).

7.3.9. TECNOLOGÍAS DE OXIDACIÓN AVANZADA

Las tecnologías de oxidación avanzada son procesos que implican generación de radicales muy reactivos. Los fundamentos básicos de tales procesos utilizan oxidantes fuertes (O_3 , H_2O_2 , fotones, electrones y combinaciones de ellos como por ejemplo O_3/UV , $O_3/H_2O_2/UV$, H_2O_2/UV etc.) a temperatura ambiente para iniciar la oxidación; existen también aquellos que utilizan oxígeno molecular a temperaturas y presiones elevadas denominados procesos de oxidación húmeda tanto en condiciones subcríticas como supercríticas (Mendoza, 1994).

7.3.10. FOTÓLISIS

En presencia de radiación UV se puede producir la fotólisis de gran número de compuestos orgánicos; sin embargo, la eficacia del proceso depende fundamentalmente de la capacidad de absorción del sustrato y de la presencia de otros compuestos que absorben a la misma longitud de onda.

Los procesos fotoquímicos para la destrucción de BPCs, PCDDs y PCDFs se inician con una fuente de luz ultravioleta que causa una ruptura homolítica en el enlace C-Cl. El proceso de descomposición necesita una fuente permanente de hidrógeno disponible, en presencia de metanol o hexano como donadores de hidrógeno efectivo. Una observación importante es la ruptura en la posición "orto" del anillo; las radiaciones UV en el rango de 170-200 nm llevan asociadas una mayor energía (704-598 kJ/mol) y son más eficaces en la ruptura de los enlaces de los compuestos orgánicos. Su principal desventaja es la formación de PCDDs y PCDFs (Alford-Stevens et. al, 1986b).

7.3.11. MÉTODO UV/ H_2

Para eliminar el problema de formación de disolventes clorados existe un proceso patentado que utiliza gas hidrógeno y una longitud de onda corta de radiaciones ultravioleta. Este sistema ha sido probado en unidades de campo para la descontaminación de aceites de transformador. Durante la reacción se producen bifenilos que la inhiben por lo que deben ser retirados continuamente por destilación, pero el proceso es efectivo para BPCs en aguas contaminadas con un máximo de 350 ppm. Su principal desventaja, es que puede producir fotoproductos clorados más tóxicos que lo BPCs (Mendoza, 1994).

7.3.12. MÉTODO UV/ O_3 , O UV/ H_2O_2

La Corporación Waste Research ha desarrollado el proceso "Ultrox" que involucra luz ultravioleta y ozono como catalizador en la oxidación de organoclorados en aguas industriales y lodos de ríos contaminados con BPCs. En este proceso, el agente oxidante es el ozono; este método también se puede llevar a cabo utilizando H_2O_2 obteniéndose resultados similares. En estos procesos, las uniones carbón-halógeno se rompe antes que el resto de las estructuras sean oxidadas y los átomos de halógeno aparecen en solución como iones libres. La magnitud del

efecto es mayor a bajas concentraciones (1 ppm). Su desventaja es la producción de compuestos clorados más tóxicos (Mendoza, 1994).

7.3.13. OXIDACIÓN CON AIRE HÚMEDO

El proceso de Oxidación Wetox Hydrothermal para residuos orgánicos en presencia de agua funciona al 99.99% a concentraciones de 600 mg/l de BPCs operando la reacción a una temperatura de 250 °C y a una presión de oxígeno de 4.8 MPA. El proceso trabaja en un rango de temperatura de 176°C a 344 °C, para soluciones muy diluidas y con alto índice de refracción. Su capacidad como tecnología disponible es de 38 L/min (Chementator, 1993b; Lawrence y Tosine, 1976).

7.3.14. RADIACIÓN GAMMA

La radiólisis con rayos Gamma y Beta de bencenos halogenados es muy similar a los mecanismos de dechloración por reactivos organometálicos. Esta reacción deja a la molécula de BPCs en estado de radical libre altamente reactivo, debido a la ausencia de cloro, esto se debe a que el electrón generado en la solución por la interacción de una alta energía de rayos Gamma, (en este caso una molécula del solvente) que posee alta afinidad a los átomos de cloro del BPC. La reacción se lleva a cabo en cadenas en donde, los BPCs se estabilizan eliminando átomos de cloro, hasta que eventualmente alcanza una configuración estable, como el bifenilo o un polímero hidroxilado (Cordero, 1995).

7.3.15. IRRADIACIÓN DE ELECTRONES

El uso de aceleradores de electrones por medio del generador Vander Graff que dechlora clorobencenos se utiliza también para BPCs. El punto principal de interés es el efecto de la irradiación de electrones de alta energía sobre las trazas tóxicas de contaminantes persistentes en lodos y aguas residuales en los cuales, se produce la transformación de BPCs a compuestos hidroxilados. Su principal desventaja es que solo trabaja a muy bajas concentraciones de BPCs (Mendoza, 1994).

7.3.16. PARTÍCULAS BETA

La Universidad Simon Fraser ha realizado investigación sobre la dechloración de BPCs utilizando partículas Beta (2 MeV e⁻) de estroncio Sr⁹⁰ como fuente de radioactividad y varios isómeros de BPCs en aceites de transformador. Demostraron que la destrucción más eficiente se lleva a cabo en soluciones libres de oxígeno y conteniendo un donador de hidrógeno alcalino. Para desarrollar la reacción en cadena se requieren grandes cantidades de radiación. Su desventaja es el alto costo y el personal altamente calificado para la operación (Mendoza, 1994).

7.4. CONFINAMIENTOS EN SITIOS CONTROLADOS

El método consiste en el depósito de los tanques con BPCs y material contaminados con él en vertederos controlados y supervisados por la U.S.EPA u organismo legislativo correspondiente. Los depósitos en vertederos de residuos contaminados con BPCs están restringidos a casos muy concretos y bajo determinadas condiciones y para concentraciones de menos de 500 ppm de BPCs. Este procedimiento sólo está autorizado en los Estados Unidos y algunos países con legislación al respecto; sin embargo, en algunos casos ha planteado problemas de lixiviados y descomposición del BPC a temperatura ambiente (CFR, 1990).

Resumiendo, son muy diversas las tecnologías de tratamiento físicoquímico que existen actualmente; sin embargo sus limitaciones de aplicación a bajas concentraciones de BPC y altos costos restringen su aplicación.

Los métodos físicoquímicos comúnmente utilizados, transforman los BPCs en compuestos más fáciles de tratar en procesos posteriores llegándose incluso a su completa eliminación. Sin embargo, apesar de que los trabajos de investigación realizados en este campo son muy amplios, las líneas de investigación y desarrollo de tecnologías que se están desarrollando son modificaciones de las ya existentes con el fin de perfeccionar las técnicas en sí, y las características del producto final así como, hacer los procesos más costeables.

Aun y con todos los métodos que se conocen actualmente, existe una creciente necesidad de desarrollo de líneas de investigación que conlleven a soluciones prácticas. Tales alternativas de tratamiento, deberán estar elaboradas en la re-evaluación de las propuestas ambientalmente aceptables y el análisis de toxicidad de los residuos generados de tal manera que permitan el desarrollo de criterios de decisión para determinar el grado de tratamiento en función del costo; estableciendo la frontera entre la sofisticación y la utilidad del proceso.

Capítulo VIII.

AGENTES TENSOACTIVOS

8. UTILIZACIÓN DE AGENTES TENSOACTIVOS

Un agente tensoactivo es una molécula que consta de una porción hidrofóbica unida a una parte hidrofílica, la cual puede ser de naturaleza aniónica, catiónica o no iónica. Debido a la naturaleza bipolar de dichas moléculas, los agentes tensoactivos tienden a congregarse entre dos fases inmiscibles separadas por una tensión superficial particular, propiedades fisicoquímicas por las cuales, son de gran utilidad potencial en la aplicación de los procesos de descontaminación (Kosaric et. al., 1987).

8.1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS AGENTES TENSOACTIVOS

Estructuralmente la porción hidrofóbica de la molécula consta de uno o más ácidos grasos de cadena larga, unida a un extremo hidrofílico como por ejemplo, una molécula de azúcar, derivados de ésteres, grupos funcionales de alcohol, lípidos neutros y grupos carboxilatos de ácidos grasos o aminoácidos (Laha y Luthy, 1992).

Ciertos grupos de agentes tensoactivos, alteran las propiedades de las superficies de los compuestos sobre los cuales actúan, afectando su carga superficial e hidrofobicidad además de saturar la superficie de los compuestos hidrófobos, para lograr ésto, es necesario realizar una selección minuciosa y específica del tipo de tensoactivo para aplicarlo a un compuesto en particular (Rosemberg, 1986).

8.2. APLICACIÓN DE AGENTES TENSOACTIVOS

Los agentes tensoactivos cationicos, generalmente se utilizan en los estudios del rompimiento de la estructura de las membranas celulares debido a su intercalamiento entre las bicapas de los fosfolípidos, solubilizando los lípidos y los constituyentes de las proteínas. Por el contrario, los agentes tensoactivos no ionicos en general muestran menor actividad antibacteriana y son susceptibles de ser biodegradados fácilmente ya que pueden ser utilizados como fuente de carbono (Laha y Luthy, 1992).

La aplicación de agentes tensoactivos en el tratamiento biológico de compuestos orgánicos hidrófobos, se debe principalmente a su capacidad para incrementar la biodisponibilidad del contaminante haciendolo un poco soluble, por lo que han sido de gran utilidad en sistemas de restauración biológica de suelos y reactores de lecho fluidizado, favoreciendo por ende, la biodegradación del contaminante (Doelman, 1994); sin embargo, existen ciertos aspectos a considerar como son:

- La solubilización de los compuestos orgánicos hidrofóbicos en soluciones acuosas con tensoactivos es un fenómeno micelar, lo cual produce un ligero incremento de la solubilidad del compuesto si se aplica a concentraciones menores a la formación micelar critica lo cual facilita la biodegradación del compuesto. (Laha y Luthy, 1992).

- La concentración micelar crítica (CMC) del agente tensoactivo, es la concentración a la cual las micelas empiezan a formarse. Las micelas son estructuras coloidales en las cuales la porción hidrófoba de las moléculas del agente tensoactivo están orientadas hacia la parte central del compuesto hidrófobo, con los grupos hidrofílicos orientados hacia la fase acuosa; por lo tanto, la adición de un agente tensoactivo a concentraciones superiores a la CMC, no mejora la disminución en la tensión superficial y puede traer consigo además, la disminución e incluso inhibición de la biodegradación del compuesto hidrófobo ya que existe un incremento en la DBO debido a la presencia del agente tensoactivo (Ziengenfuss, 1987).
- La adición de agentes tensoactivos puede llegar a ser tóxica, debido al trastorno de las membranas celulares provocado por su interacción con los componentes estructurales lipídicos y sus reacciones con las enzimas y proteínas esenciales para los sistemas microbianos (Laha y Luthy, 1992).
- Sus efectos inhibitorios, están relacionados con las interacciones fisiológicas entre el micelo del agente tensoactivo y los microorganismos, posiblemente a través de la complejidad del material de la membrana celular aún sin producir trastornos de la estructura laminar de la misma (Laha y Luthy, 1992).

8.3. RESTAURACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

La adición de agentes tensoactivos al suelo, recientemente se ha sugerido como una técnica innovadora para reducir la tensión interfacial y mejorar la fase de separación de los compuestos orgánicos hidrofóbicos que se encuentran contaminando los suelos, facilitando su movilidad y biodisponibilidad para ser transformados por los microorganismos (Laha y Luthy, 1992).

En los procesos de restauración de suelos contaminados, los tensoactivos no iónicos interactúan con la materia orgánica del suelo de tres formas: 1) a través de las interacciones de las superficies hidrofóbicas; 2) entre las cadenas de los hidrocarburos de las moléculas del agente tensoactivo y 3) en las regiones hidrofóbicas de la materia orgánica (Laha y Luthy, 1992).

El rango de biodegradación de los BPCs en los reactores biológicos depende además, de la biodisponibilidad del compuesto la cual está a su vez, en función de su solubilidad y transporte al interior de la célula.

En resumen, actualmente existe un creciente interés en la aplicación de agentes tensoactivos en los procesos de tratamiento biológicos para mejorar la degradación de los compuestos organoclorados, ya que con la adición del agente tensoactivo en los bioreactores, se incrementa el rango de biodegradación facilitando el transporte del compuesto a través de las paredes celulares de los microorganismos.

Por otra parte, la aplicación de agentes tensoactivos en los reactores de biopelícula es uno de los factores que influyen en la transferencia de oxígeno hacia la biopelícula, debido a la adsorción del agente tensoactivo sobre la superficie de la burbuja de oxígeno reduciendo su tensión superficial, originando burbujas más pequeñas y por lo tanto, un área interfacial específica gas-líquido mayor para la transferencia de oxígeno. Sin embargo, los agentes tensoactivos así adsorbidos (especialmente las macromoléculas), tienen el inconveniente de disminuir el coeficiente de transferencia de masas por la disminución de la movilidad de la burbuja en superficie y la formación de una zona tensoactiva interfacial menos permeable (Zamora, 1996); lo que se puede traducir, en una reducción del rendimiento del proceso biológico aunado a que bajo ciertas circunstancias, los agentes tensoactivos pueden ser también utilizados por los microorganismos como fuente de carbono lo que origina que los microorganismos los prefieran en lugar de atacar los compuestos contaminantes.

Capítulo IX.

NITRACIÓN DE BPCs

9 NITRACIÓN DE BPCs

9.1. GENERALIDADES DE LAS SUSTITUCIONES AROMÁTICAS

Las propiedades químicas del bifenilo son muy similares a las del benceno. Se nitra y halogena de modo típicamente aromático (Brewster y McEwen, 1963). El bifenilo experimenta la sustitución aromática electrófila con mayor facilidad que el benceno, ya que el sustituyente fenilo es activante y director a las posiciones *orto* y *para* (Streitwieser y Heathcock, 1990).

La nitración y la cloración de bifenilo son reacciones irreversibles, comúnmente denominadas sustituciones normales ya que no son influidas por la temperatura, por otras condiciones de la reacción, ni por factores de orden estérico. La sustitución electrofílica, se considera como un reemplazamiento de un átomo de hidrógeno del núcleo insaturado intacto, al ser atacado por ion positivo, o un fragmento electrofílico equivalente. Las reacciones se llevan a cabo en medios ionizados como soluciones de ácido sulfúrico concentrado, o bajo la influencia de catalizadores que favorecen la formación de especies iónicas.

La escasa reactividad a la sustituciones de los haluros de arilo (grupo de compuestos a los que pertenecen los BPCs), ha sido atribuida a la disminución de la densidad electrónica de los anillos aromáticos.

Se considera que en los BPCs, los anillos bencénicos son híbridos que estabilizan la molécula, lo que le proporciona carácter de doble enlace a la unión carbono-cloro, así estos dos átomos se mantienen enlazados por algo más que un sólo par de electrones y el enlace es más firme que si fuera una simple unión. En esta unión, el cloro posee una carga positiva y en las posiciones *orto* y *para* con respecto al halógeno tienen una negativa. De aquí la escasa reactividad se debe al efecto de disminución de la densidad electrónica en ambos anillos; ésta estabilidad incrementa la E_{act} para el desplazamiento, por lo que disminuye la velocidad de reacción de una segunda sustitución con otro grupo diferente.

La conversión del anillo bencénico en ion bencenio implica una pérdida de la aromaticidad y por lo tanto es endotérmica. Recíprocamente, la eliminación de un protón del átomo de carbono (sp^3) del ion da lugar a la recuperación de la aromaticidad de manera exotérmica (Weininger y Stermitz, 1988). La estabilización de la molécula por la resonancia comprende las estructuras de Kekulé en los que el carbono que contiene el halógeno, presenta hibridación de solapamiento de los orbitales sp^2 y el enlace con el halógeno resulta más corto y fuerte y la molécula más estable, lo cual dificulta la ruptura del enlace C—Cl.

Al introducir un grupo nitro (NO_2) en un bifenilo policlorado, la nueva sustitución electrofílica en los anillos del bifenilo se efectúa típicamente como en los sistemas aromáticos, por lo tanto, la nitración transcurre según el mecanismo electrofílico iónico.

La facilidad con que se efectúa las reacciones de sustitución electrofílica depende en gran parte de la presencia de otros sustituyentes que existan previamente en los anillos. Cuando un bifenilo que se somete a una reacción de sustitución contiene más de un radical, la posición relativa y la naturaleza de los diferentes grupos de sustitución presentes, pueden determinar un

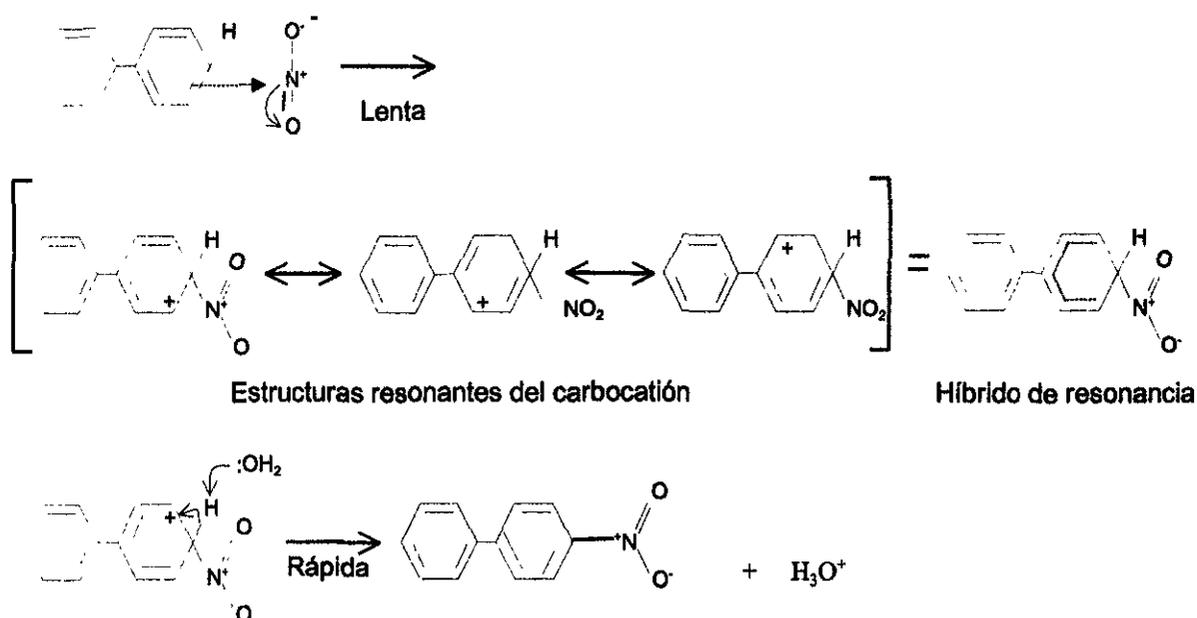
efecto antagónico o una acción sincrónica sobre el curso de la reacción de la nueva sustitución. Sin embargo, cuando un halógeno se une directamente a uno o ambos anillos, estos compuestos presentan una química especial tanto en los métodos de preparación como en su reactividad y la influencia de activación o desactivación de un nuevo sustituyente sobre los anillos de bifenilo, se atribuye a un efecto inductivo que puede operar en dos direcciones distintas. Los átomos de cloro por ser sustituyentes con pares de electrones libres poseen la excepcional propiedad de transmitir una influencia activadora a las posiciones *orto* y *para* y por regla general, la sustitución *para* predomina en sobre la *orto*, pero a la vez ejercen un débil influjo desactivador sobre el anillo, debido al efecto inductivo que se transmite a través de los orbitales σ .

La magnitud y dirección de desplazamiento de los centros eléctricos de los átomos de cloro y nitro dirigentes está dada por las medidas de sus momentos dipolares 1,56 *D* y 3,97 *D* respectivamente, se debe tomar en cuenta entonces que el momento dipolar es la suma de ambos valores, lo cual indica que los sustituyentes colocados en posiciones opuestas del anillo cooperan en la producción de un desplazamiento electrónico en la misma dirección de la molécula.

Con la introducción de un grupo nitro, el punto de ebullición del cloronitrobifenilo formado aumenta mucho más de lo que correspondería al incremento sufrido por el peso molecular (120 a 130 °C para los nitroderivados del benceno). 1,2-*o*-nitrobifenilo 37 °C P.F. y 320 °C P.E. y para él para 1,4-*p*-nitrobifenilo 114 °C P.F. y 340 °C P.E. (Fieser y Fieser, 1960).

El mecanismo de la nitración comprende el ataque del ión nitronio (NO_2^+) sobre los electrones π del anillo bencénico y la formación de ion bencenio (Figura IX-1). La pérdida posterior de un protón del carbono que sostiene al grupo nitro da lugar al anillo nitrado (Weiniger y Stermitz, 1988), de tal forma que el grupo nitro se une al anillo a través del átomo de hidrógeno cargado positivamente, con la carga negativa deslocalizada sobre ambos átomos de oxígeno:

Fig. No. IX-1.- Mecanismo de nitración del bifenilo (Weiniger, 1988)



Las condiciones empleadas en la reacción de nitración suelen ser muy drásticas, pero pueden modificarse a voluntad regulando la temperatura y la concentración del reactivo, de tal forma que, ciertas nitraciones pueden efectuarse utilizando ácido nítrico fumante ($\delta=1,52$ g/ml). En la reacción se libera agua que diluye el ácido nítrico empleado: $\text{ArH} + \text{NO}_2\text{OH} \rightarrow \text{ArNO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, con el objeto de compensar esta pérdida de eficacia a medida que progresa la reacción, se utiliza una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico (mezcla sulfonítrica) que absorbe el agua formada durante la reacción. Sin embargo, ciertas nitraciones se realizan muy bien en solución acética (con acético glacial que absorbe agua); incrementado su eficiencia, si el ácido acético se sustituye por anhídrido acético, en cuyo caso el verdadero agente nitrante es el nitrato de acetilo, $\text{CH}_3\text{COONO}_2$ y la nitración de uno de los anillos clorados rinde alrededor de 30% o-nitroclorobenceno y 70 % de su isómero *para*.

El carácter consistentemente electrofílico del grupo nitro atacante, proporciona una indicación de que la polaridad desempeña un papel dominante en las sustituciones; otra indicación es que el grupo nitro tiene una influencia desactivante de los reactivos electrofílicos, puesto que contiene átomos clave en un estado polarizado; una posible segunda sustitución ocurriría teóricamente en la posición *meta* del anillo pero resulta más fácil de nitrar el otro anillo aromático.

La presencia de los grupos nitro, en las posiciones *orto* o *para* con respecto al halógeno, incrementan la reactividad de la molécula para sustituir los cloros presentes y convertirlo en otro compuesto y a medida que aumenta el número de grupos nitro con respecto a la sustitución de los átomos de cloro en las posiciones *orto* y *para* de ambos anillos, se incrementa su reactividad; la importancia de este proceso, radica en que los átomos de cloro del nitroclorobifenilo son más fácilmente reemplazables que los átomos de halógenos, en un anillo no nitrado. El mecanismo del desplazamiento del halógeno es debido probablemente al ataque de algún ion negativo u otro agente nucleofílico por un lado de la molécula. La baja densidad electrónica en el núcleo aromático del anillo clorado y nitrado en posición *para* evidenciado por su momento dipolar (2,5 D), determina su fuerte atracción de donadores de electrones (bases); de aquí, que el átomo de halógeno pueda ser reemplazado por otros grupos básicos. Este efecto, se magnifica en los anillos clorados *di* y *trinitrados*, éstos últimos muy poco probables en cuanto a formación por motivos estéricos y de inactivación.

9.2. PROPIEDADES DEL GRUPO NO_2

Una propiedad fundamental del grupo nitro, es su polaridad debido al carácter iónico de la quinta valencia del nitrógeno. El grupo nitro, es muy estable frente a muchos reactivos; por lo general es inerte a los ácidos y a la mayoría de los reactivos electrófilos por ello, puede estar presente en el anillo aromático cuando se efectúan reacciones con este tipo de reactivos. La reacción más importante del grupo nitro en los compuestos aromáticos es la reducción, pero el producto de reducción depende de las condiciones de reacción utilizadas (Streitwieser y Heathcock, 1990).

Muchas de las propiedades del grupo nitro pueden interpretarse con base en un híbrido de resonancia de dos estructuras de Lewis. Los ácidos de Lewis están deficientes de electrones y son capaces de aceptar un par de ellos (Weininger y Stermitz, 1988). Así, el ácido reacciona con los reactivos generando especies electrófilas que son las que atacan realmente al anillo Figura IX-2.

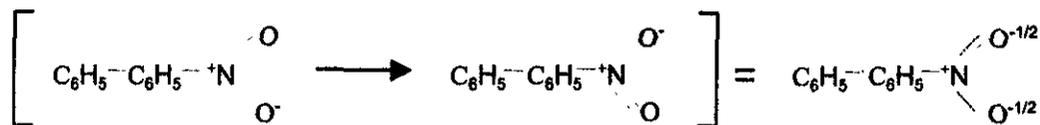
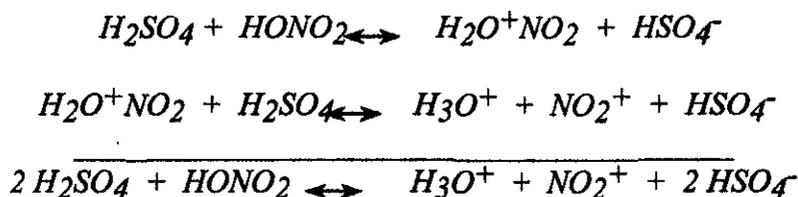


Fig. No. IX-2.- Estructuras resonantes del grupo nitro (Weininger, 1988).

En estas estructuras, se observa que el grupo O—N—O posee un sistema π tipo aniónico alílico. La estructura del ion nitronio ha sido determinada por espectroscopía y es análoga a la del bióxido de carbono (compuesto isoelectrónico). La molécula lineal es un potente reactivo electrófilo (Streitwieser y Heathcock, 1990):



El proceso de nitración directa, cuando se realiza con mezclas de ácidos nítrico y acético o anhídrido acético constituyen un método satisfactorio para preparar derivados mono- y dinitrados. Cuando se utiliza una mezcla de ácidos nítrico y sulfúrico (mezcla sufonítrica) se establece un equilibrio en el que están presentes muchas especies, una de ellas, es el ion nitronio (NO_2^+); esta especie produce la mezcla de los ácidos a través de un proceso en el que el ácido sulfúrico actúa como ácido y el nítrico como base de Lewis:



La teoría electrónica moderna de orientación en la sustitución aromática electrófila, comprende una evaluación del efecto del grupo nitro sustituyente sobre las energías relativas de los estados de transición de tipo catión pentadienílico, para que se efectúe la reacción de sustitución en las diferentes posiciones posibles. Cuando el ion nitronio reacciona con uno de los anillos del bifenilo se produce el catión pentadienilo intermedio (figura IX-3) (Streitwieser y Heathcock, 1990). La reacción tiene lugar sobre el nitrógeno en lugar de sobre el oxígeno:

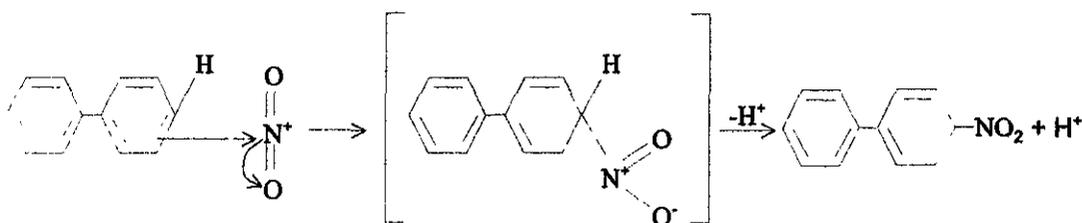
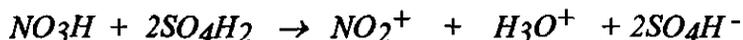


Fig. No. IX-3.- Ataque del ion nitronio al bifenilo (Streitwieser, 1990).

9.3. CARACTERÍSTICAS DE LA NITRACIÓN DE BIFENILOS

- Son reacciones irreversibles.
- Son sustituciones electrófilas aromáticas normales.
- Las condiciones empleadas en la reacción de nitración suelen ser muy drásticas, pero pueden modificarse regulando la temperatura y la concentración del reactivo (Fieser, 1960).

Los bifenilos se nitrán con facilidad utilizando mezclas de ácidos nítrico y acético o anhídrido acético (figura IX-4). También se pueden utilizar otros agentes nitrantes como tetrafluoroborato de nitronio, pero requieren de condiciones muy especiales. Cuando la reacción se lleva a cabo con una solución de mezcla sulfonítrica, el agente nitrante activo es el ion nitronio (NO_2^+), cuya existencia se establece por el grado de la disminución del punto de congelación al ácido sulfúrico al añadir ácido nítrico. La disminución es exactamente cuatro veces mayor que la de un soluto ideal, lo que significa que se producen cuantitativamente cuatro iones, correspondientes a la siguiente reacción (Beyer y Walter, 1987).



Los estudios cinéticos de la reacción de nitración como toda sustitución electrófila, han demostrado que el paso que determina la velocidad de la reacción es dimolecular y depende de la velocidad de las concentraciones del grupo nitro y del bifenilo (reacciones S_E^2). (Beyer y Walter, 1987). El hecho de que el aumento en la polaridad del disolvente no incremente la velocidad de sustitución, indica que durante el paso que determina la velocidad de reacción ni se crean ni se destruyen cargas iónicas, comprobado por la formulación de la reacción en un proceso bimolecular de dos pasos (Fieser y Fieser, 1960).

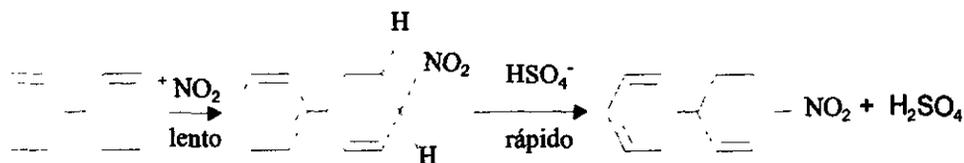
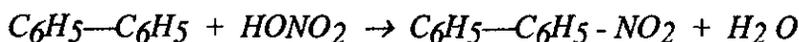


Fig. No.IX-4.- Mecanismo de nitración del bifenilo (Fieser, 1960).

La mezcla sulfonítrica, tiene la misión de mantener la concentración del HNO_3 en ellas. Así, el H_2SO_4 irá separando el H_2O a medida que se produce evitando la dilución del HNO_3 :



En la etapa final, el H_2SO_4 funciona como de aceptor de protones, sin embargo en la reacción, el papel principal del ácido sulfúrico no consiste en la eliminación de agua sino en catalizar la protonación del ácido nítrico a ion nitroacidio $H_2NO_3^+$ el cual, pierde agua y genera al ion nitronio

(Barlet y Pierre, 1970); así el ácido nítrico proporciona a la reacción un protón catalizador según el siguiente equilibrio (Hart et. al, 1995):



El análisis sencillo de la reacción de nitración se inicia con la introducción del ion nitronio deficiente de electrones al anillo, dando por resultado un catión pentadienílico intermedio que pierde un protón y da origen al producto bencénico nitrado (StreitwieserHeathcock, 1990). En el mecanismo de la reacción, el ion nitronio ataca de forma electrófila al núcleo aromático y se une a él a través de un complejo π y a partir del ion carbenio se separa un protón, obteniéndose el anillo nitrado, con regeneración del sistema aromático (Morrison y Boyd, 1990). Es decir, como el ion nitronio necesita electrones, los encuentra particularmente disponibles en la nube π del anillo, de modo que en el paso rápido de la reacción, se une a uno de los carbonos por medio de un enlace covalente generando el carbocatión llamado ion bencenio (en el anillo de BPC) (Figura IX-5):

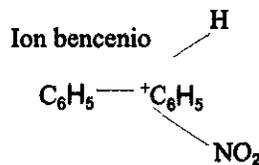


Fig. No IX-5.- Estructura de Ion bencenio (Morrison,1990).

La estructura de este carbocatión, se representa por tres estructuras que sólo difieren en la ubicación de los dobles enlaces y de la carga positiva y por lo tanto, el verdadero ion es un híbrido de resonancia de estas tres estructuras, lo que significa que la carga positiva no se encuentra localizada sobre un sólo átomo de carbono sino que está distribuida sobre la molécula y por el fenómeno de resonancia este ion es más estable (Morrison y Boyd, 1990); en la figura IX-6 la línea de puntos, representa enlaces parciales debido a los electrones π deslocalizados:

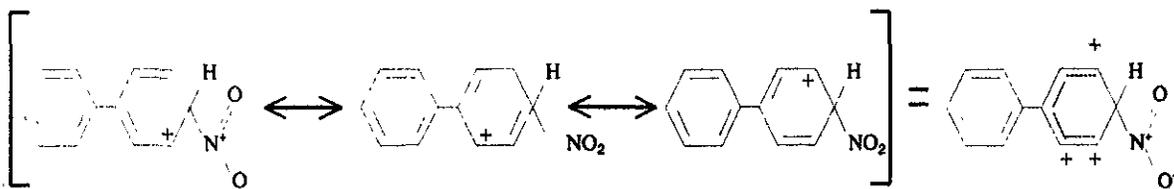
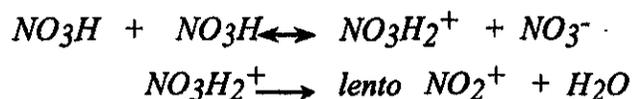


Fig. No. IX-6.- Estructuras resonantes del bifenilo nitrado (Morrison,190)

La nitración en solución acética consta también de dos pasos, el más lento de los cuales es la formación del ion nitronio (Fieser y Fieser, 1960):



La técnica de nitración, se lleva acabo en recipientes de material antiácido o en acero inoxidable provistos de dispositivos que permitan una rápida refrigeración y calentamiento (para

el control de la velocidad de reacción) con agitación continua para mantener emulsionado el compuesto. La refrigeración es necesaria debido al gran desprendimiento de calor producido por la nitración y la absorción de agua formada por el H_2SO_4 . La temperatura debe mantenerse baja en un rango de 40 a 50 °C para evitar la acción oxidante del ácido nítrico.

9.3.1. SUSTITUCIONES ELECTROFILÍCAS MÚLTIPLES DE LOS ANILLOS DEL BIFENILO

El mecanismo de la sustitución aromática electrófila consiste en la combinación de una especie positiva o electrófila con un par de electrones π de los anillos para formar un intermedio, que posee una estructura de catión pentadienílico; con estados de transición semejantes al catión pentadienílico al que finalmente da lugar, por tanto, los factores que modifican la energía relativa o estabilidad de este catión intermedio, también afectan de modo sustancial aunque en menor proporción a la energía relativa o estabilidad del estado de transición (Weininger y Stermitz, 1988; Streitwieser y Heathcock, 1990). Ahora bien, un sustituyente situado previamente sobre el anillo (en este caso los átomos de cloro) afectarán la posición de todos los sustituyentes que se introduzcan posteriormente (grupos nitro) de dos maneras (McMurry, 1994):

- a).- Influyen en la reactividad del anillo aromático.
- b).- Influyen en la orientación de la reacción.

9.4. REACTIVIDAD DE ANILLO AROMÁTICO

En principio, la determinación del efecto de los átomos de cloro sobre la reactividad y orientación de la sustitución del nuevo grupo nitro en el anillo esta en función de la velocidad relativa de reacción y la diferencia en la velocidad de formación de los carbocationes, está determinada por una diferencia en E_{act} es decir, por una diferencia en la estabilidad de los estados de transición; así, los factores que estabilizan al ion por dispersión de la carga positiva deben estabilizar por la misma razón, al carbocatión incipiente del estado de transición. Es decir, por una parte los átomos de cloro unidos previamente a los anillos afectan la estabilidad del carbocatión, dispersando la carga positiva debido a su naturaleza de atracción de electrones por lo cual, desestabilizan al carbocatión desactivando al anillo. En cambio, una vez introducido el grupo nitro, éste ejerce un efecto inductivo de atracción de electrones lo que tiende a intensificar la carga positiva desestabilizando al carbocatión y haciendo que la reacción sea más lenta (Morrison y Boyd, 1990).

La sustitución electrofílica del grupo nitro en los BPCs (figura IX-7), se lleva a cabo en dos pasos: el electrófilo se une a uno de los átomos de carbono del anillo mediante dos electrones π , formando un enlace σ . Este carbono adquiere una hibridación sp^3 ; y el anillo actúa entonces como un donador de electrones π (como un nucleófilo), hacia el grupo nitro electrófilo. Durante esta reacción del anillo bencénico, el catión pentadienílico intermedio pierde un protón y en esta reacción se regenera el complejo π aromático (Streitwieser y Heathcock, 1990). El carbocatión

resultante es un ion bencenonio, en el cual la carga positiva se deslocaliza por resonancia, sobre los carbonos *orto* y *para* al que está unido el átomo de cloro; es decir, *orto* y *para* al átomo de carbono con hibridación sp^3 (Hart y Hart, 1995).

Por consiguiente, en el primer paso que generalmente es lento, se pierde energía de estabilización (energía de resonancia) del anillo aromático, debido a la destrucción del sistema aromático π que es el que determina la velocidad de sustitución. Esta destrucción causada por la adición del electrófilo a uno de los carbonos del anillo, requiere energía y un electrófilo fuerte (Hart y Hart, 1995).

En el segundo paso se recupera la energía de resonancia aromática por la pérdida de un protón y el proceso es sumamente rápido:

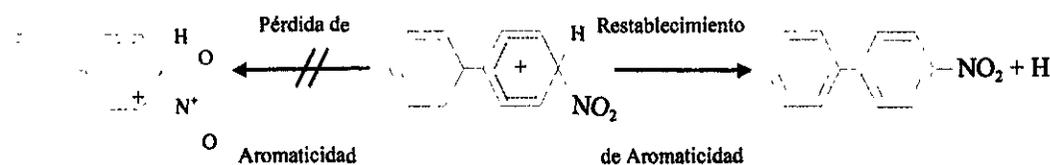


Fig. No. IX-7.- Sustitución electrofílica del bifenilo (Hart, 1995).

Ahora bien, el catión pentadienílico estabilizado por resonancia, suele representarse empleando una línea de puntos para indicar que la carga positiva se deslocaliza sobre las tres posiciones indicadas en las estructuras de resonancia (figura IX-8) (Streitwieser y Heathcock, 1990); y la velocidad de sustitución completa, está determinada por la unión lenta del reactivo electrofílico al anillo aromático para formar el carbocatión que, una vez generado, pierde rápidamente un ion hidrógeno (protón) para dar el producto por consiguiente, ésta es la etapa que determina la velocidad. Sin embargo, puesto que no implica la ruptura del enlace C—H su velocidad y en consecuencia la de todo el proceso, es independiente del isótopo específico de hidrógeno presente (Morrison, y Boyd 1990) de éste modo, la sustitución se considera completa cuando el átomo de carbono sp^3 al que se unió el electrófilo pierde un catión (Hart y Hart, 1995).

Por otra parte, la dirección y magnitud de los desplazamientos eléctricos se debe a los momentos dipolares del anillo clorado (1,56 D); los momentos dipolares de los BPCs son excepcionalmente pequeños; ya que son moléculas no polares y el desplazamiento de electrones hacia el elemento más electronegativo hace relativamente negativo al halógeno y relativamente positivo al carbono (Bartet y Pierre, 1970).

Los electrones π móviles de los anillos y del doble enlace carbono-carbono deberían ser fácilmente desplazables sin embargo, debido a la resonancia en las estructuras que contienen átomos de cloro doblemente enlazado hay una carga positiva en el halógeno y una negativa en el carbono, estas estructuras tienden a oponerse al desplazamiento normal de electrones hacia el halógeno, en la medida en que contribuyen a los híbridos.

Por otra parte, un carbono con hibridación sp^2 es de hecho un átomo muy electronegativo por que su tendencia a donar electrones al cloro es muy escasa. Así, el efecto inductor de los átomos de cloro que se deduce de sus momentos dipolares explica la influencia desactivadora del

sustituyente es decir, el hecho de que faciliten o dificulten la entrada de nuevos sustituyentes, pero no explica la orientación de los mismos (Fieser y Fieser, 1960).

Sin embargo, puede encontrar una explicación a este hecho, en la determinación por difracción de electrones de las distancias interatómicas del enlace C—Cl en el anillo clorado que es de 1,70 Å lo que parece inferirle cierto carácter de doble enlace debido a un efecto de resonancia por lo cual, el anillo clorado se considera como un híbrido de resonancia de 4 estructuras:

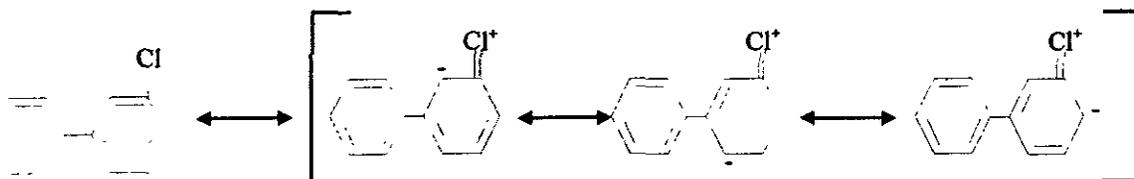


Fig. No IX-8-.- En la estructura compuesta, resultante las mezclas de todas las formas anteriores, el halógeno está unido al anillo por un enlace que participa simultáneamente del carácter de simple y de doble y por consiguiente aparece como intermedio entre ambos, tanto en longitud como en fuerza de combinación (Fieser, 1960).

9.4.1. ORIENTACIÓN DE LA SUSTITUCIÓN ELECTRÓFILA DEL GRUPO NITRO

Los átomos de cloro son sustituyentes de primer orden saturados en el punto de enlace con el núcleo y dirigen la entrada con preferencia al segundo sustituyente a las posiciones *orto* y *para*, con mayores rendimientos de los derivados en *para*. La velocidad de sustitución y el lugar de la segunda sustitución electrofílica (nitración) en los anillos depende decisivamente de la interacción del primer sustituyente en los anillos. Esto se puede describir mediante los efectos que disminuyen la densidad electrónica del anillo (Beyer y Walter, 1987):

Efecto I.- Los átomos de cloro, como consecuencia de la mayor electronegatividad de sus átomos unidos al átomo de carbono de los anillos, atraen a él los electrones y ejercen por lo tanto un *efecto inductivo* de disminución de la densidad electrónica del anillo (Beyer y Walter, 1987).

Efecto M.- En la mayor parte de los casos, al efecto I- se presupone un segundo efecto, que se origina como consecuencia de la participación de pares de electrones aislados o electrones π de dobles enlaces de los sustituyentes en la mesomería del anillo. Esta interacción se denomina *efecto mesómero* que según la naturaleza de los sustituyentes, actúa aumentando o disminuyendo la densidad electrónica del anillo por lo tanto los anillos previamente clorados poseen un efecto *M+* ya que el átomo del sustituyente unido directamente al anillo posee al menos un par de electrones aislados con lo cual aumentan la densidad electrónica, y cuanto más es la electronegatividad del átomo unido al anillo tanto más difícil es positivarlo. Sin embargo, en la introducción de un grupo NO_2 , tanto el efecto mesómero como el inductivo actúan a la vez. Ambos pueden estar dirigidos en el mismo sentido y conducen en definitiva, a una disminución de la densidad electrónica del anillo, que es la responsable de la velocidad de sustitución electrofílica y no es fácil decir a priori cual de los dos efectos predomina en un caso particular por

ejemplo, la segunda sustitución electrofílica (nitración) del BPC se produce más despacio que la cloración (primera sustitución) del bifenilo debido a que el átomo de cloro como consecuencia de su elevada electronegatividad, posee un fuerte *efecto I-*, parcialmente compensado por su pequeño *efecto M+*, de tal forma que el anillo se empobrece de electrones. Y así, una vez introducido el grupo nitro en el anillo, ambos *efectos (I- y M-)* actúan desactivando el anillo y dificultarán la entrada de un tercer reactivo electrófilo.

Con esto, aparentemente queda explicado el efecto dirigente del primer sustituyente (átomos de cloro), de tal forma que por su efecto *M+* se incrementa la densidad electrónica de las posiciones *orto* y *para* de los anillos del bifenilo que resultan activadas para el segundo ataque electrofílico (nitración). Sin embargo, esta interpretación no es del todo correcta ya que la distribución electrónica se refiere al estado fundamental de la molécula y para el transcurso de la reacción, es decisiva la distribución electrónica en el estado de transición; en este caso, y en primera aproximación, se puede considerar como tal el ion carbenio intermedio del complejo σ (formación de un nuevo enlace con 5 carbonos en lugar de 6 debido a la deslocalización electrónica con disminución de la estabilidad aromática) que se forma.

Ahora bien, la entrada del segundo sustituyente (grupo nitro) en las posiciones *orto* y *para* respecto a los átomos de cloro dependen en primer lugar de que producto intermedio o que estado de transición sea energéticamente más favorable, de modo que los complejos σ , en razón de su polaridad, son esencialmente más sensibles a la influencia de los sustituyentes polares que la molécula en el estado fundamental (Beyer y Walter, 1987).

En resumen, el efecto inductivo asociado con los átomos de cloro tienden a atraer los electrones, lo que origina una densidad de electrones disminuida por todo el anillo desestabilizando al carbocatión y favoreciendo el ataque del grupo NO_2 , aceptor de electrones que reaccionará preferentemente en los centros de máxima densidad electrónica, y en los anillos clorados, tales centros están situados en las posiciones *orto* y *para*. Además de esto, el influjo dirigente a *orto* y *para* de los átomos de halógeno puede interpretarse también como una consecuencia del efecto de resonancia. Por inducción, los átomos de cloro tienden a sustraer electrones del anillo haciendo las sustituciones más difíciles que en el anillo sin cloros pero los centros relativamente aniónicos de las posiciones *orto* y *para* en las estructuras resonantes de los anillos clorados, representan los lugares más vulnerables a la nitración que los átomos de carbono en *meta*. Es decir, la dirección de la nueva sustitución esta determinada por la naturaleza del efecto de resonancia.

El efecto de resonancia en el bifenilo policlorado establece centros ricos en electrones en las posiciones *orto* y *para* lo que determina el curso de la sustitución sin embargo, por su poder de atracción de electrones poseen también un efecto desactivante del anillo a la vez, por ejemplo: en el 4-nitrobifenilo, uno de los anillos (A) está desactivado por la presencia del grupo nitro, pero el otro (B) no lo está; por lo tanto, el nuevo grupo se sustituye en las posiciones *orto* (2) o *para* (4) del anillo B (figura IX-9) (Fieser y Fieser, 1960; Beyer y Walter, 1987).

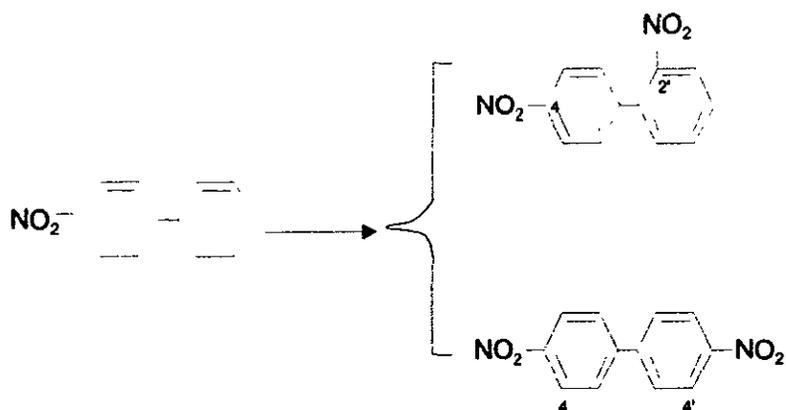


Fig. No.IX- 9.- Orientación de la sustitución del bifenilo (Beyer,1987).

Por otra parte, la influencia desactivadora del anillo que también poseen los grupos nitro, aunado a su efecto dirigente a la posición *meta*, desempeñan un papel importante en la introducción de nuevas nitraciones en el bifenilo por lo cual, se puede concluir que la dirección de las nuevas sustituciones (grupo NO_2) es preferente, pero no exclusiva sobre las posiciones *orto* y *para* lo justifica la existencia aunque en pequeños porcentajes de isómeros *meta*.

Los estudios realizados sobre los efectos de orientación en la sustitución aromática electrofílica se han basado en el análisis de la influencia que los efectos estructurales ejercen sobre la energía del estado de transición, utilizándose el catión pentadienilo como modelo del estado de transición.

La introducción de grupos NO_2 al anillo clorado, le confiere un efecto especial en el cual, los átomos de cloro de la molécula son fácilmente labilizables por la presencia de dos grupos nitro adyacentes. El mecanismo de ésta influencia labilizadora en las posiciones *orto* y *para* sobre los átomos de cloro pueden atribuirse a la incompatibilidad de los centros positivos o pobres de electrones, manifestado por resonancia con carácter atrayente de electrones del átomo de halógeno; esto explica la susceptibilidad de los átomos de halógeno para ser desplazados por reactivos aniónicos o por fragmentos negativos de tal forma que en la di-nitración de un bifenilo, el átomo de cloro localizado en la posición *orto* y el NO_2 en la posición *para* de sólo un anillo, es mucho más reactivo que el sólo anillo clorado y puede sustituirse nucleofílicamente con facilidad por otros grupos.

Por estudios de las mezclas de nitración de anillos bencénicos y otros compuestos se han determinado y corregido estadísticamente la reactividad cuantitativa de la nitración en diversas posiciones del anillo; pero sería mayor la posibilidad de nitración en la posición *para* del segundo anillo (Brewster, 1963). Tales valores son conocidos como "Factores Parciales de la Velocidad de Nitración" (Figura IX-10) que para un anillo clorado corresponden a:

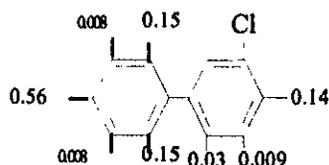


Fig. No. IX.10.- Velocidades de la nitración (Brewster, 1963)

Por estereoquímica, en la molécula los anillos del bifenilo son coaxiales y ambos núcleos bencénicos pueden girar con relativa libertad alrededor del eje que une los átomos C—C, basándose en esta configuración de la molécula, puede anticiparse que esta rotación quedará estéricamente impedida por introducción de sustituyentes más voluminosos que el hidrógeno (como lo es, el grupo nitro) y como consecuencia de ésto, ambos núcleos bencénicos no siempre pueden estar situados en un plano como en el bifenilo, sino que forman un ángulo entre sí. Estas conformaciones carecen de un centro quiral, pero poseen un eje quiral, de tal forma que estos derivados del bifenilo pueden ser resueltos analizándolos como antípodas ópticas. (enantiómeros) como sucede en la combinación de los átomos de cloro y nitro en las posiciones *orto* del 6,6'-dinitro-2,2'-diclorobifenilo (figura IX-11) (Brewster y McEwen, 1963; Streitwieser y Hetahcock, 1990):

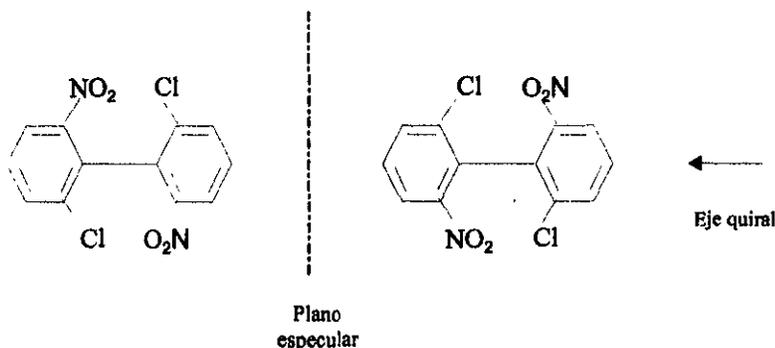


Fig. No. IX-11.- 6,6'-dinitro 2,2'-diclorobifenilo (Streitwieser, 1990).

En los estudios realizado por Chaudhary y Albro (1978), sobre la nitración de bifenilos, el 2-nitro-3',4,4',5-tetraclorobifenilo se obtuvo con un rendimiento del 92,5% por nitración del 3,3',4,4'-tetraclorobifenilo, utilizando una mezcla de ácido nítrico y anhídrido acético (figura IX-12).

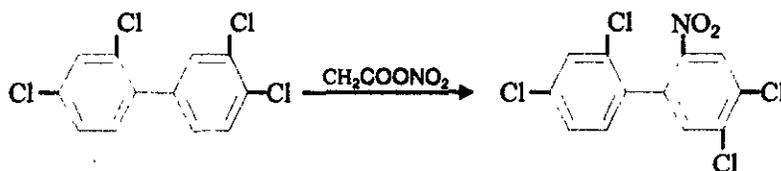


Fig. No. -IX-12.- 3,3', 4,4'-tetraclorobifenilo 2-nitro-3'-4,4',5-tetraclorobifenilo (Chaudhary, 1977).

De igual manera, el 4-nitro-4'-clorobifenilo y el 6-nitro-4,2',3',4',5'-pentaclorobifenilo (figura IX.13) se obtuvieron al nitrar los BPCs correspondientes con mezclas de nitrato de amonio, anhídrido trifluor-acético y nitrometano en los estudios realizados por Donnelly et. al, (1987).

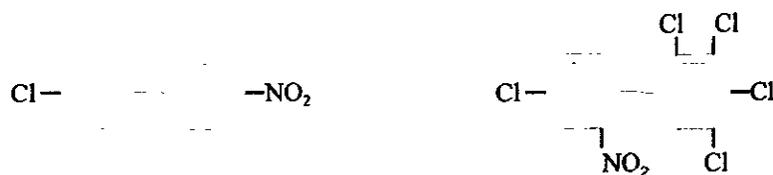


Fig. No.IX-13.- 4-nitro-4'-clorobifenilo y 6-nitro-4,2',3',4',5'-pentaclorobifenilo (Donnelly, 1987).

9.5. REDUCCIÓN DE NITROCLOROBIFENILOS

9.5.1. AMINACIÓN DEL ANILLO AROMÁTICO

En la nitración aromática estudiada anteriormente con la mezcla sulfonítrica, el grupo nitro se puede reducir fácilmente a amina en una secuencia sintética típica:



Por reducción de los compuestos dinitroaromáticos se pueden obtener tres diaminas isoméricas de posición (Beyer y Walter, 1987). La reducción catalítica es la más utilizada ya que se lleva a cabo en condiciones suaves, proporciona buenos rendimientos y no afecta a los otros grupos funcionales. La reducción química requiere de la eliminación del ácido empleado y de los residuos de Hierro.

La reducción de los grupos nitro por metales puede detenerse en estados de valencia intermedios del nitrógeno, según la naturaleza del reactivo y pH del medio. La elevada capacidad activante del grupo amino da lugar a polisustituciones y a veces, oxidación del anillo aromático (Weininger y Stermitz, 1988).

La reducción de nitrocompuestos aromáticos es el método más útil para preparar aminas porque utiliza materiales fáciles de adquirir y genera aminas primarias aromáticas (Morrison y Boyd, 1985).

En los compuestos aminoaromáticos el punto de fusión más elevado se encuentra siempre en el isómero más simétrico es decir, el isómero *orto* que es el que tiene siempre el punto de ebullición más bajo (Fieser y Fiser, 1960).

Las arilaminas son básicas, el par electrónico no compartido del nitrógeno puede unirse a los ácidos de Lewis, produciendo una sal de arilamonio. La fuerza básica de una amina tiene una relación inversa con la fuerza ácida de su ion amonio correspondiente. Sin embargo, son menos básicas que las alquilaminas debido a que el par de electrones del nitrógeno está deslocalizado

por superposición de orbitales con el sistema electrónico π del anillo aromático; por tanto, está menos disponible para formar un enlace. En términos de resonancia, las arilaminas están estabilizadas debido a las cinco estructuras de resonancias contribuyentes (McMurry, 1994) (figura IX-14):

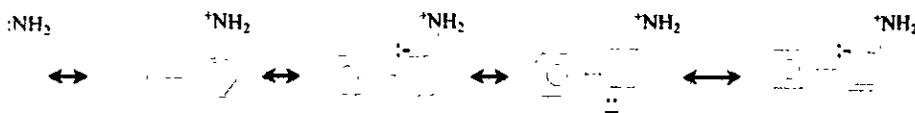


Fig. No. IX14.- Estructuras de resonancia de las Arilaminas (McMurry, 1994).

Sin embargo, por protonación se pierde la estabilización de resonancia, ya que sólo son posibles dos estructuras de resonancia para el ion arilamonio (figura IX-15):



Fig.No. IX-15.- Estructuras de resonancia del Arilamonio (McMurry, 1994).

Como resultado de esto, la diferencia de energía (ΔG°) entre las formas protonadas y no protonadas es muy grande por lo que las arilaminas son ligeramente básicas. Ahora bien, dependiendo de la naturaleza de los sustituyentes, las arilaminas sustituidas pueden ser más o menos básicas que la anilina. Como regla general, los sustituyentes que reducen la reactividad de un anillo aromático hacia la sustitución electrófila ($-\text{Cl}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$) también reducen la basicidad de la arilamina (McMurry, 1994).

La mejor manera de entender el efecto de los grupos sustituyentes sobre la basicidad de las arilaminas consiste en observar los diagramas de energía de reacción para el paso de la protonación de una amina. Los sustituyentes desactivadores hacen al anillo más deficiente en electrones, de este modo reducen la estabilidad del ión cargado positivamente. Así, se observa un ΔG° menor para la protonación de una arilamina activada que para la protonación de una arilamina desactivada (McMurry, 1994). La disminución en la basicidad de las arilaminas se atribuye en parte al efecto inductivo, atrayente de electrones que ejerce el grupo fenilo (Streitwieser y Hetahcock, 1990).

9.6. GENERALIDADES DE LAS AMINAS

Las aminas son derivados del amoniaco (NH_3), en los que uno o más de los átomos de hidrógeno unidos al átomo de nitrógeno se han sustituido por grupos arilo o alquilo (RNH_2 , R_2NH y R_3N); generalmente actúan como bases de Lewis o como nucleófilos debido a las propiedades del par de electrones no enlazantes sobre el átomo de nitrógeno. El efecto más importante es la participación de este par de electrones en la resonancia del anillo aromático (Weininger y Stermitz, 1988).

En las aminas, el nitrógeno utiliza orbitales sp^3 que se dirigen hacia los vértices de un tetraedro. Tres de estos traspasan orbitales s de hidrógeno o carbonos, mientras el cuarto contiene un par de electrones no compartidos, en consecuencia, las aminas son piramidales y tienen casi los mismos ángulos de valencia (Morrison y Boyd, 1985).

Como el amoniaco, las aminas son compuestos polares y pueden formar puentes de hidrógeno intermoleculares. Las aminas aromáticas se oxidan fácilmente con el aire y con frecuencia se les encuentra coloreadas por productos de oxidación (Morrison y Boyd, 1985).

La química de las aminas está dominada por un par de electrones no compartidos del nitrógeno; debido a este par las aminas son básicas y nucleófilas, reaccionan con ácidos de Lewis para formar sales ácido/base y reaccionan con electrófilos en muchas reacciones polares (McMurry, 1994).

Además de su comportamiento como *base*, las aminas primarias y secundarias también pueden considerarse *ácidos* extremadamente débiles, ya que sus protones N-H pueden sustraerse por medio de una base lo suficientemente fuerte (McMurry, 1994).

9.7. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE AMINAS AROMÁTICAS

9.7.1. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE MASAS

En la espectroscopía de masas, *la regla del nitrógeno* establece que compuestos con número impar de átomos de nitrógeno tiene peso molecular impar. Así, la presencia de nitrógeno en una molécula se detecta simplemente observando su espectro de masa. Un ion molecular impar generalmente significa que el compuesto desconocido tiene uno o tres átomos de hidrógeno; por el contrario un ion molecular par, generalmente significa que el compuesto tiene cero o dos átomos de nitrógeno. La lógica de esta regla, deriva del hecho de que el nitrógeno es trivalente y en consecuencia, requiere un número impar de átomos de hidrógeno en la molécula (McMurry, 1994)

9.7.2. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Las aminas primarias y secundarias pueden identificarse por medio de espectroscopia infrarroja. Las aminas primarias se identifican por la absorción característica de la vibración de tensión del enlace N-H que da lugar a una absorción en el intervalo de 3300 a 3500 cm^{-1} en forma de un par de bandas en el espectro infrarrojo, debido a la vibración de la tensión simétrica y asimétrica de cada uno de los enlaces. Las aminas secundarias dan lugar a una sola banda en la zona de 3350 cm^{-1} pero con una intensidad muy débil (Weiniger y Stermitz, 1988). Las aminas terciarias no absorben en esta región puesto que no tienen protones N-H. Los alcoholes también

absorben en este intervalo pero las bandas de absorción de las aminas suelen ser más agudas y menos intensas que las bandas de los hidroxilos.

Además de observar las bandas características N-H, si la muestra contiene un grupo amino, la adición de una pequeña cantidad de ácido mineral produce una banda de amonio ancha e intensa en el intervalo de 2200 a 3000 cm^{-1} ya que todas las aminas protonadas presentan esta absorción fácilmente observable causada por el enlace amonio R_3NH^+ (McMurry, 1994).

9.7.3. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Con frecuencia es difícil identificar las aminas utilizando solamente la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de H^1 , debido a que los protones N-H tienden a presentarse como resonancias muy anchas sin un acoplamiento bien definido con los protones C-H vecinos, ya que la situación es similar a la de los protones hidroxílicos O-H y al igual que éstos, los protones N-H de aminas pueden absorber en un intervalo muy amplio, ($\delta=2,2$ a $2,6$ ppm) y se identifican mejor por medio de la adición de una pequeña cantidad de D_2O al tubo de la muestra. En el cual, ocurre un intercambio de N-H por N-D, y la señal de N-H desaparece del espectro de RMN. Las fragmentaciones que experimentan las aminas en el espectrómetro de masas tienen su origen en el ion molecular de la eliminación de uno de los electrones no enlazables del átomo de nitrógeno (Weininger y Stermitz, 1988).

Los protones en el carbono adyacente al nitrógeno se encuentran un poco desprotegidos debido al efecto atrayente de electrones del nitrógeno, por tanto absorben a campo más bajo que los protones de un alcano.

En el espectro de RMN de C^{13} , los carbonos adyacentes a los nitrógenos de las aminas están ligeramente desprotegidos y absorben a campo aproximadamente 20 ppm más bajo de aquél al que deberían absorber en un alcano con estructura similar (McMurry, 1994).

En resonancia RMN puesto que el nitrógeno es más electronegativo que el carbono, se desapantallan los protones próximos al grupo amino. Los desplazamientos a campo más bajo no son tan pronunciados como en los alcoholes. Los protones unidos directamente al nitrógeno en las aminas primarias y secundarias resuenan en una posición de la región comprendida entre $\delta = 0.6$ y 3.0 ppm. La posición exacta de la resonancia depende de la pureza de la muestra, de la naturaleza del disolvente, de la concentración y de la temperatura a la que se realiza la determinación (Streitwieser y Heathcock, 1990).

Son muy pocas las reacciones que se conocen que permiten introducir directamente sustituyentes en el núcleo aromático. La nitración de los BPCs es una reacción que no está influenciada por la temperatura, pero está determinada por la influencia directriz de los átomos de cloros de la molécula y suele llevarse bajo condiciones drásticas que pueden modificarse a voluntad regulando la concentración y tipo de los reactivos utilizados en el proceso, dando por

resultado compuestos mono y dinitrados en posiciones *para* y *orto* los cuales pueden ser fácilmente reducidos con excelentes rendimientos a aminas primarias.

Una característica importante de esta reacción, es su comportamiento químico labilizador de los átomos de cloro vecinos al grupo nitro introducido con lo cual, las moléculas de BPCs pueden ser decloradas reductivamente. Además una vez reducido a grupo amino, éstos pueden ser fácilmente sustituidos por grupos hidroxilos, requisito indispensable para la ruptura del anillo por la acción de enzimas mono y dioxigenasas en los tratamientos biológicos, con lo cual, se facilita grandemente la biodegradación aerobia de la molécula. Por ésta razón, se considera factible que al adicionar una molécula de nitrógeno en uno o ambos anillos de la molécula de BPC mediante el tratamiento químico, la molécula presente otra vía de acceso para la ruptura de los anillos.

Capítulo X.

***BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS
AROMÁTICOS***

10 BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS

El éxito de la biodegradación de los BPCs depende del conocimiento detallado de las interacciones entre las enzimas producidas por los distintos grupos de microorganismos, las rutas metabólicas de los subproductos generados y las características fisicoquímicas de la molécula a degradar para poder establecer las bases para el desarrollo de sistemas de biodegradación utilizando bioreactores con resultados satisfactorios.

Los compuestos aromáticos clorados entran por difusión pasiva a través de las membranas lipídicas de pared celular de los microorganismos, como regla general, las reacciones bioquímicas que suceden en ellas están catalizadas por enzimas. El metabolismo de los compuestos aromáticos es típicamente un proceso bifásico en el cual, el compuesto experimenta reacciones bioquímicas de oxidación, reducción o hidrólisis comúnmente denominadas "primera fase de reacción" en las que se introduce un grupo funcional apropiado dentro de su estructura, por ejemplo un grupo $-OH$ o $-NH_2$ para encadenarse con otra parte endógena (principalmente del retículo endoplasmático celular) en donde se realizan las reacciones metabólicas en un segundo paso de conjugación denominada "segunda fase de reacción"; en algunos casos, se realiza la conjugación directamente, mientras los metabolitos de la primera fase son excretados (Dagley, 1994).

El éxito de la biotransformación de los compuestos organoclorados depende del metabolismo microbiano que a su vez se encuentra determinado por gran variedad y tipo de reacciones enzimáticas e incluso, dependiendo de las características del compuesto, éste puede estar involucrado en varias rutas metabólicas en las que participan diferentes tipos de enzimas como cofactores por ejemplo NADPH o enzimas comunes de transferencia de electrones como los citocromos b_5 o bien, los complejos enzimáticos de ciertos mamíferos como los citocromos P450 involucrados en el metabolismo de diferentes compuestos organoclorados (Reineke, 1988).

Por otra parte, la presencia de los sistema de alta actividad enzimática en la biopelícula, es un reflejo de la buena adaptación de la biocenosis al sustrato lo cual facilita la determinación del rango metabólico de la población microbiana por pruebas de determinación enzimática, las cuales suelen ser excelentes herramientas para medir la actividad de la biomasa y determinar además, la capacidad de degradación de un compuesto específico.

En estos sistemas, los compuestos aromáticos clorados se transforman en compuestos de menor peso molecular por la acción de enzimas hidrolíticas excretadas por la biocenosis, subcompuestos que son asimilados por la misma biomasa y utilizados como fuentes de carbón y energía durante el proceso metabólico (Nybroe et al., 1992; Frolund et al., 1995).

Las pruebas analíticas de enzimas más importantes están basadas en reacciones catalíticas sobre un sustrato cromógeno, el producto puede ser detectado por ensayos fotométricos (Tueber y Brosich, 1977) este tipo de prueba puede ser simplificado para reducir los tiempos de reacción y los complicados procedimientos de separación (Holzapfel-Pschorn et al., 1988;) utilizados en sistemas de biopelículas (Gschobl et al., 1996).

Gran variedad de microorganismos aerobios realizan la hidroxilación del anillo bencénico utilizando oxígeno y facilitando la ruptura del anillo y las reacciones subsecuentes (Dagley, 1994); para ello, el oxígeno molecular se utiliza como aceptor terminal de electrones durante la respiración y para la inserción del grupo hidroxilo de activación para el rompimiento del anillo de los compuestos aromáticos (Reineke, 1988).

10.1. FISIÓN ANAEROBIA DEL ANILLO BENCÉNICO

Bajo condiciones anaerobias, la degradación de anillo se lleva a cabo por medio de tres tipos de reacciones secuenciales (Figura X-1); cada una de las cuales se inicia con la reducción del ácido benzóico (1) a ácido ciclo hexano carboxílico (2). En la ruta de reacción principal (a) característica de ciertos cultivos puros de *Pseudomonas sp*, los átomos de hidrógeno eliminados de los metabolitos se transfieren anaerobicamente al nitrato y el Adenosin Trifosfato (ATP) para tal crecimiento, lo proporciona el flujo de electrones a través de la cadena de citocromos (Evans, 1977).

Existe además, otra ruta metabólica (b) estudiada en la cepa fotosintética de *Pseudomona palustris* que utiliza ácido benzóico anaerobicamente como única fuente de carbono; la reacción es esencialmente similar a la β -oxidación de los ácidos grasos, estos procesos anaerobios tienen una importante contribución en el ciclo del carbono debido a la resonancia por conjugación de las ligaduras insaturadas que son removidas por reducción (Dagley, 1994).

En este tipo de reacción, la deshidrogenación y la adición de agua seguida por una segunda deshidrogenación ocurre secuencialmente como en la ruta (a) pero en este caso, el sustrato es la correspondiente ester-coenzima A; y concordando con esto, el anillo ciclo hexanona se abre por tiólisis en lugar de hidrólisis; y otra diferencia entre las rutas propuestas, es el paso de descarboxilación en la posición 3-4 el cual es exclusivo de la ruta (a).

El ácido benzóico puede ser también convertido a metano vía anaerobia por consorcios de microorganismos en una tercera ruta "C" en la que se forman varios compuestos intermedios (2, 3, 4 y 5) utilizados como aceptores terminales de electrones dependiendo del microorganismo que actúe; la hidrólisis y la deshidrogenación rinden también ácidos grasos libres en esta secuencia sin embargo, es necesario que cierta proporción de estos productos sirva como fuente de acetato para aceptar hidrógenos en reacciones catalizadas por consorcios metanogénicos (Dagley, 1994).

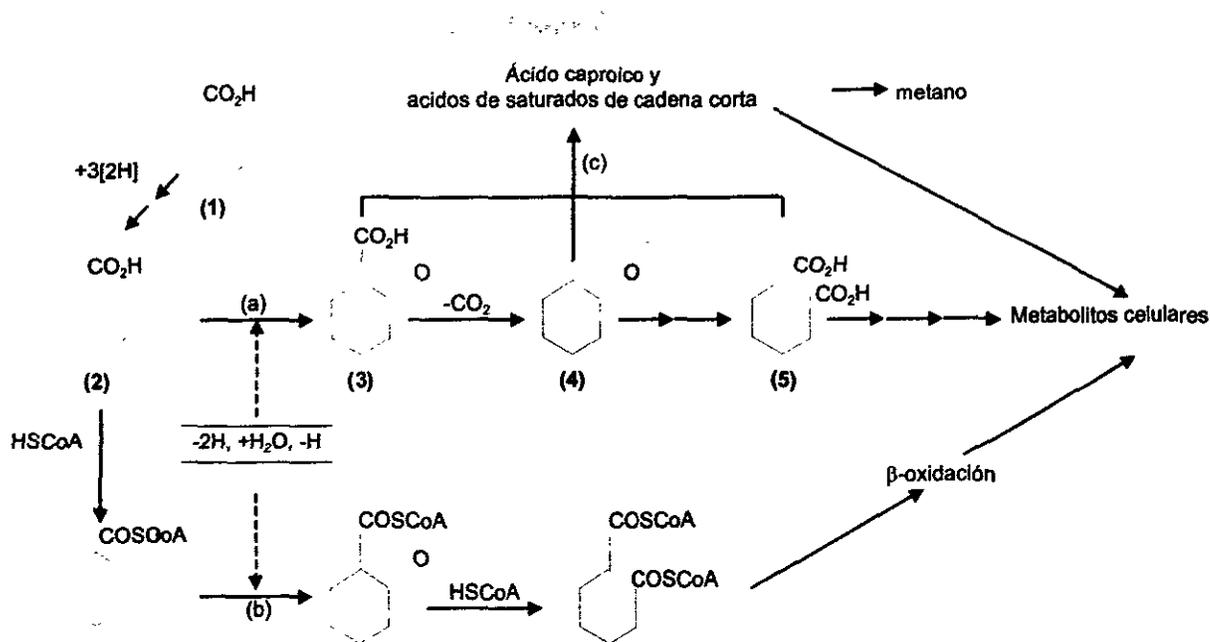


Fig. X-1.- Reacciones secuenciales propuestas para el crecimiento anaerobio a partir del ácido benzoico. En cada uno de los casos el anillo (1) es primeramente reducido a una estructura de ciclohexano (2). La secuencia (a) es utilizada por ciertas bacterias desnitrificantes que transfieren los átomos de hidrógeno al ión nitrato. La secuencia (b) se realiza por *Pseudomona palustris* (fotosintética) la cual obtienen carbono por un proceso semejante a la β-oxidación de los ácidos grasos; y la secuencia (c), se realiza por microorganismos anaerobios que forman ácidos grasos de cadena corta los cuales por aceptar los átomos de hidrógeno transferidos, se convierten en metano por las bacterias metanogénicas (Dagley, 1994).

10.2. RUPTURA AEROBIA DEL ANILLO BENCÉNICO

En la ruptura aerobia de los anillos de benceno (Figura X-2) el principal punto de rompimiento (líneas punteadas) se inicia cuando el anillo se abre (1) y el oxígeno se fija en el producto de reacción de dos modos diferentes para la ruptura (2) formando compuestos de rompimiento en *meta* (a) y compuestos de rompimiento en *orto* (b), ambos catalizados por las enzimas 4,5- y 3,4-dioxigenasas del ácido dihidroxibenzoico (ácido protocatéquico) respectivamente.

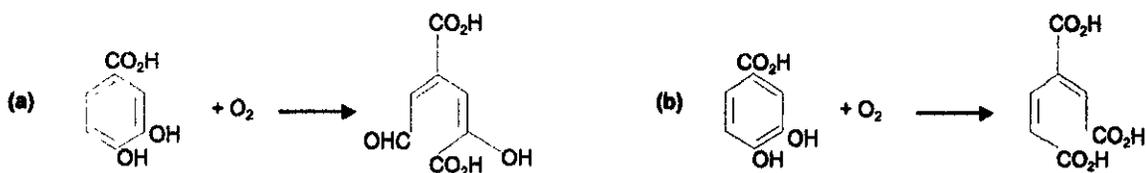
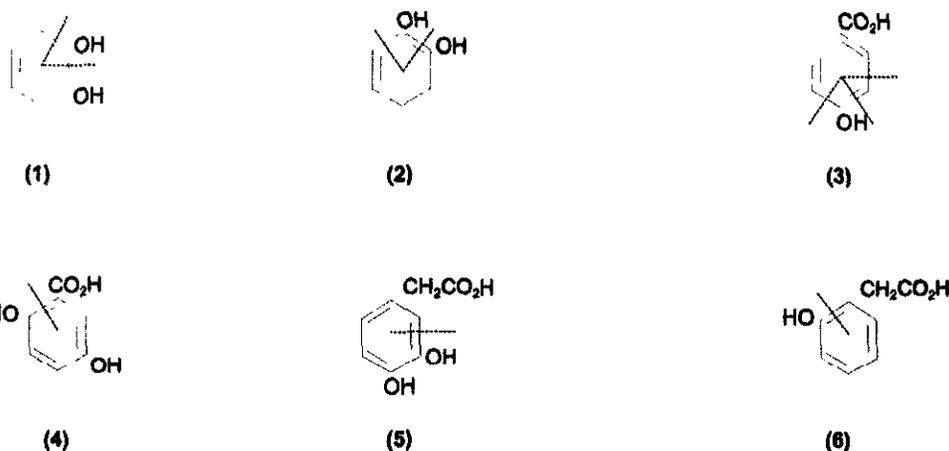


Fig. No. X-2.- Fisión de los anillos bencénicos catalizados por dioxigenasas. Los principales sustratos para estas enzimas son los compuestos catecol (1); hidroxiquinol (2); ácido protocatequico(3); ácido gentísico (4); ácido homoprotocatequico (5); y ácido homogentísico (6). Para la ruptura de un anillo bencénico en cada posición (líneas punteadas) se requiere la incorporación de oxígeno en cada sustrato como se muestra en la reacción catalizada por las enzimas 4,5-dioxigenasa protocatequica (a) y 3,4-dioxigenasa protocatequica (b) (Crawford, 1975).

Existe además, un tercer sitio de ataque del compuesto (3) conocido como fisión en *meta* realizada por la enzima 2,3 dioxigenasa protocatequica de ciertas cepas de *Bacillus sp.* (Crawford, 1975) lo que demuestra que aún y cuando un microorganismo puede abrir el anillo bencénico en varios modos diferentes, debe elaborar distintas enzimas dioxigenasas para cada ocasión.

La presencia de dos grupos hidroxilos situados apropiadamente es el prerrequisito para el rompimiento del anillo; frecuentemente, estos dos grupos están situados en carbonos adyacentes o en posiciones *para* uno de otro (4 y 6) como en los ácidos gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) y homogentísico. Una excepción a esta regla, es el rompimiento del anillo con un solo grupo OH realizada por una cepa de *Bacillus sp.* que utiliza 5-cloro -2-hidroxibenzoato como fuente de carbono en el cual, una enzima dioxigenasa lleva a cabo el rompimiento del anillo de una manera similar a la del ácido gentísico y en el que el cloro toma el lugar de un grupo hidroxilo en el carbono 5 del gentisato (Crawford et. al., 1979).

10.2.1. MECANISMOS DE REACCIÓN PARA LA RUPTURA DEL ANILLO

En general bajo condiciones aerobias, antes de que el anillo pueda abrirse es necesaria la preparación del núcleo para la ruptura por introducción de dos grupos hidroxilos. Esta reacción catalizada por enzimas flavoproteínas monooxigenasas (Dagley, 1994) involucra la reducción de los cuatro electrones del dioxígeno del cual, un átomo de oxígeno es adicionado al sustrato aromático y el segundo átomo es reducido a agua a expensas de un nucleótido piridina reducido (NADPH) (Ballou, 1982):



Estas enzimas son muy específicas para el sustrato particular, por lo tanto la enzima 3-hidroxilasa que actúa sobre el 4-hidroxibenzoato es una enzima diferente de las enzimas 4-hidroxilasa que actúa también sobre el 4-hidroxibenzoato y de la enzima 3-hidroxilasa que actúa sobre el 4-hidroxifenil acetato (Ballou, 1982).

El ataque de la enzima monooxigenasa sobre el núcleo bencénico, utiliza NADH para generar ATP; por el contrario la reacción de ruptura del anillo por si misma, ni consume ni genera energía. En este paso, se asemejan a todas aquellas reacciones que siguen del rompimiento de la cadena de carbono para formar eventualmente metabolitos del ciclo de Krebs en las cuales la fuente potencial de energía para estas secuencia, utiliza enzimas deshidrogenasas dependientes de NAD.

Existen diferentes tipos de reacción que rompen los enlaces carbono-carbono después de que el anillo ha sido abierto (figura X-3). La primera reacción (1) esta catalizada por una enzima aldolasa que actúa sobre un sustrato que contiene grupos hidroxilo y ceto sustituidos en las posiciones 1,3-; ésta es también, una forma estructural de la fructuosa 1,6-difosfato, sustrato de las enzimas aldolasas más utilizada en la glicólisis (Ballou, 1994).

La segunda reacción (2) muestra la hidrólisis de la 1,3-dicetona; la tercera reacción (3) es similar a aquellas reacciones catalizadas por las enzimas tiolasas de la β -oxidación de los ácidos grasos en las cuales, la tioesterificación confiere propiedades de carbonilo en el carbón carboxílico del ácido original.

La cuarta reacción, (4) muestra la descarboxilación de un β -cetoácido. Ahora bien, los sustratos formados por la ruptura de los anillos bencénicos poseen dos cadenas etilénicas conjuntas preparadas para la transformación.

La hidratación del compuesto de la ecuación (5) proporciona el sustrato del compuesto de la ecuación (1) y siguiendo con la ruptura de la posición *orto* del anillo de un compuesto catecol se forma lactona, que actúa sobre la hidrólisis del compuesto de la ecuación (6) rindiendo un β -cetoácido, tioester que se puede romper por la *coenzima A* como el compuesto de la ecuación (3).

La ecuación (7) muestra la descarboxilización del ácido 2-hidroxi *cis*- mucónico que ocurre cuando hay transferencia de electrones, similar a los compuestos de la ecuación (4),

Fisión de enlaces C-C

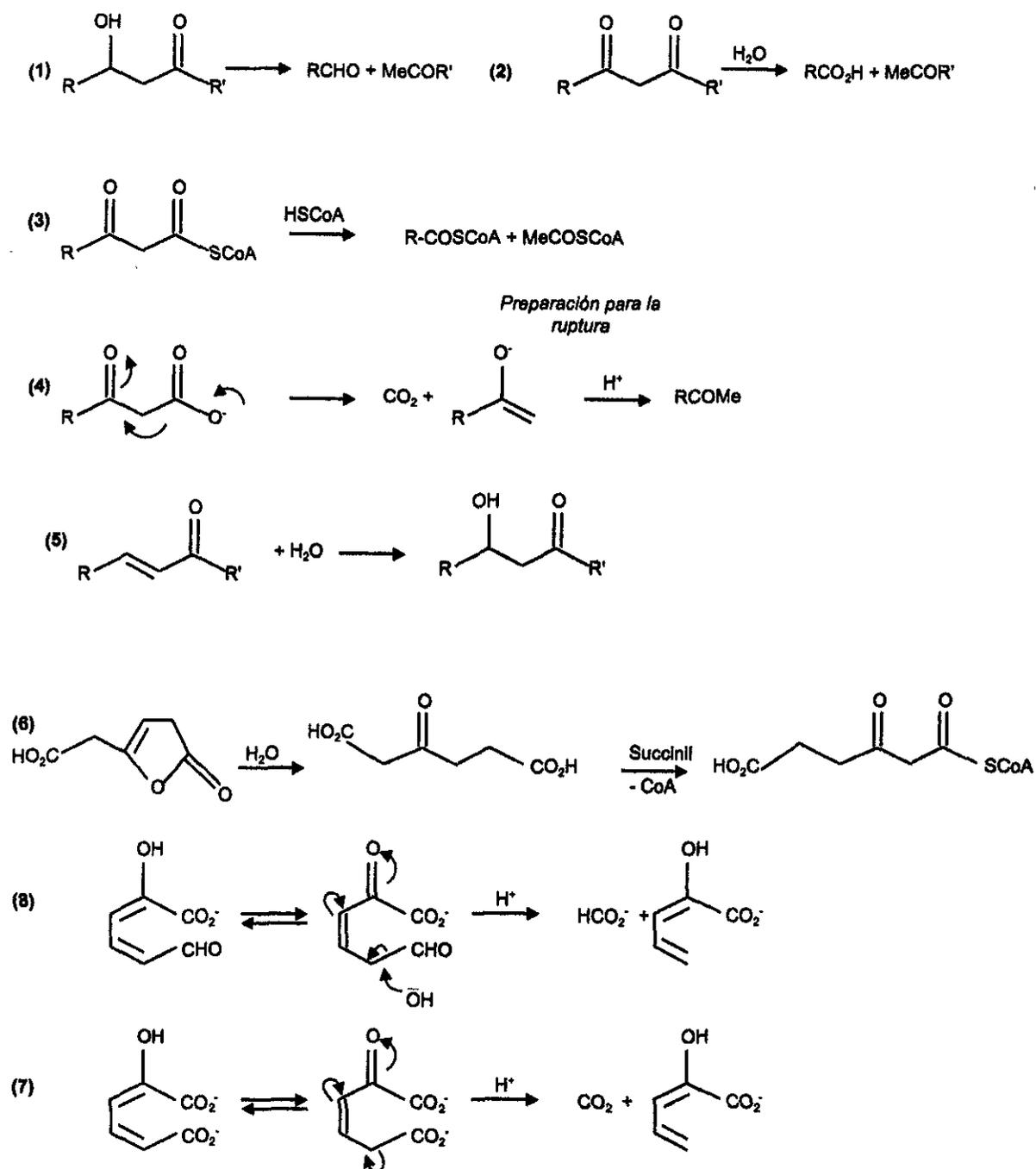


Fig.No. X-3.- Tipos de reacciones involucradas en la ruptura de los enlaces carbono-carbono de los sustratos encontrados en el catabolismo de compuestos aromáticos (1) Ruptura Aldol; (2) hidrólisis de la 1,3-cetona; (3) tiolisis de la *coenzima A* β -cetoácido; (4) descarboxilación del β -cetoácido. Después de que el anillo ha sido abierto, el sustrato está preparado para: (5) la hidratación de una cadena etilénica; (6) la hidrólisis de una lactona para dar un cetoácido seguido por la esterificación con una *coenzima A* y eliminación de CO_2 o formato a partir del producto de ruptura de un anillo bencénico (7) u (8) (Dagley, 1994).

formándose un compuesto vinilo análogo al β -cetoácido por esta descarboxilación. El compuesto de la ecuación (8), se considera como una reacción poco usual por la cual, el formato o acetato se elimina por hidrólisis de los productos catecol o 3-metilcatecol del rompimiento en la posición *meta*. La descarboxilación rinde entonces, un sustrato propio para la enzima de tal manera que los sustratos formados por la ruptura de los anillos de benceno poseen dos dobles enlaces conjugados que deben ser preparados para la transformación por reacciones que introducen la forma estructural de la fructuosa antes mencionada hidrolasa (Dagley, 1994).

10.2.1.1. RUTAS DE RUPTURA DEL ANILLO

De acuerdo con Dagley (1994), la transformación del anillo bencénico se realiza por medio de dos rutas metabólicas con ruptura del anillo en las posiciones *orto* o *meta*. En estos procesos metabólicos, la enzimología de la ruptura en la posición *meta* del ácido protocatequico es totalmente distinta a la del ácido homoprotocatequico, que involucra diferentes enzimas dioxigenasas y aldolasa. La ruptura en la posición *orto* difiere además, en los tipos de reacción y las enzimas involucradas en ella.

La ruta de ruptura del anillo en la posición *meta*, puede llevarse a cabo por diferentes secuencias metabólicas; por ejemplo a) por medio de rutas oxidativas e hidrolíticas de los compuestos catecol; b) por el metabolismo de los ácidos 4-hidroxifenilacético, homoprotocatecol y ácido gentísico; c) a través del metabolismo del ácido protocatequico por la enzima 4,5-dioxigenasa y d) por medio del metabolismo del ácido 3-*O*-metilgálico con formación biológica de metanol. Sin embargo, la ruta más importante y más frecuentemente utilizada es la primera.

10.2.1.2. RUTAS DE RUPTURA EN META

En este tipo de ruptura, la secuencia metabólica de transformación (Figura X-4) se inicia cuando la enzima catecol-2,3-dioxigenasa oxida al catecol (1) a hemialdehído-2-hidroxiacético que es metabolizado por dos rutas ya sea oxidativa o hidrolítica. La reacción de hidrólisis elimina el formato y rinde el ácido 2-hidroxi-penta-2,4-dienóico (8) mientras que la ruta oxidativa involucra una isomerización previa a la descarboxilación, rindiendo el mismo compuesto intermedio anterior (8).

La prueba de esta isomerización, fue establecida por Collinsworth (1973), quien demostró que cuando el compuesto 4-metilcatecol (2) se transforma a través de esta enzima, se genera un compuesto isómero *cis* del ácido 2-hidroxi-hexa-2,4-dienóico (9) formado como un metabolito; el isómero *trans*- que no es metabolizado, no se elimina por isomerización del doble enlace entre los C-4 y C-5 y de este modo, permite la rotación al C-5, proceso que no puede ocurrir por la generación del grupo metileno en el C-3 a través de la tautomerización del compuesto ceto-enol (Dagley, 1944).

La ruta hidrolítica sirve para la transformación de los compuestos 3-metilcatecol (4); 2,3-dihidroxi- β -fenil propionato (5) y del 2,3-dihidroxi-*p*-cumato (6) este último, producto de la

transformación cuando *Pseudomona putida* utiliza hidrocarburos tales como el *p*-cimeno como fuente de carbono (7) (DeFrank, 1977). La conversión de los compuestos (7) y (8) involucran varios pasos de oxidación de los compuestos metilo a carboxilo y la introducción de dos grupos hidroxilos por reacciones que involucran un compuesto *cis*-dihidrodiol; entonces, una enzima dioxigenasa específica (enzima d) para el compuesto 2,3-dihidroxibenzoato abre el anillo y ocurre la descarboxilación, la hidrólisis libera entonces isobutirato y forma el compuesto (8) de la secuencia de rompimiento en posición *meta* de los compuestos catecoles (Wigmore y Ribbons, 1980). El compuesto 2,3-dihidroxi- β -fenilpropionato (5) es un metabolito de los ácidos cinámico, hidroxicinámico y 2-hidroxihidrocinámico (ácido melilótico).

Después de abierto el anillo, la enzima c succinato es liberada por hidrólisis; y el compuesto 3-metilcatecol es transformado por la misma enzima que *Pseudomona putida* utiliza para los compuestos catecol (1) aunque la estructura del 3-metilcatecol puede impedir la entrada de la ruta oxidativa.

Fig. No. X-4.- La figura a continuación muestra las rutas de transformación meta de compuestos catecol (1); 4-metilcatecol (2); ácido protocatequico (3). Esta ruta, se lleva a cabo mediante cepas de *Bacillus* sp. mientras que otras cepas de bacterias utilizan los compuestos 3 metil catecol (4); ácido 2,3-dihidroxi- β -fenilpropiónico (5); ácido 2,3-dihidroxi-*p*-cumico (6); y un metabolito de *p*-cimeno (7). Las tres rupturas del anillo las cataliza la misma enzima "a" catecol 2,3-dioxigenasa. Las enzimas b, c, y d son dioxigenasas diferentes. La ruta oxidativa que involucra NAD se encuentra a la derecha y la ruta hidrolítica a la izquierda.

En ciertas ocasiones, algunos microorganismos elaboran una enzima 2,3-dioxigenasa específica para el ácido protocatequico (3) y son capaces también de utilizar enzimas de rompimiento en la posición *meta* de los compuestos catecol para su transformación. La reacción final de esta ruta tiene una especificación estérica de adición de agua a los compuestos (8) y (9) generándose el compuesto L(S)-hidroxi-cetoácido y la ruptura aldol, produce piruvato más acetaldehído o propionaldehído, productos que siguen siendo transformados hasta formar malatos y piruvatos para entrar al ciclo de Krebs (Crawford, 1975).

10.2.1.3. RUTAS DE RUPTURA EN ORTO

Cuando los compuestos catecol y ácido protocatequico se transforman por la ruta de fisión *orto* (Figura X-5), la estrategia metabólica utilizada que se utiliza es la introducción de un átomo de oxígeno en una posición determinada de la cadena por lactonización en lugar de la hidratación; los compuestos catecol (2) y ácido protocatequico (3) son metabolizados por el mismo tipo de reacción pero catalizado por diferentes enzimas en una secuencia que converge en un mismo compuesto designado como β -ceto adipato procedente de la hidrólisis enzimática de la lactona, el cual es el sustrato apropiado para la ruptura tiolítica cuando ha sido esterificada con la *coenzima A*.

El compuesto hidroxiquinol (1) también llamado 1,2,4-bencenotriol es el catabolito del resorcinol (dihidroxifenona) en *Pseudomonas putida* (Chapman y Ribbons, 1974) y *Trichosporium cutaneum* (Gaal Neujahr, 1979) y del benzoato en *Trichosporium cutaneum* (Anderson y Dagley, 1980). Sin embargo, no es necesario que ocurra una lactonización en esta ruta ya que el oxígeno del tercer grupo hidroxilo del compuesto (1) aparece subsecuentemente en el grupo carboxilo del compuesto β -ceto adipato que se forma cuando el ácido maleilacético (4) se reduce por acción del NADH (Dagley, 1994).

Existen además, otras rutas diferentes de metabolización del compuesto β -keto adipato a partir de los compuestos catecol y ácido protocatequico que incluyen aspectos de regulación enzimática en varias especies bacterianas (Stainer y Ormston, 1973) y hongos actinomicetos.

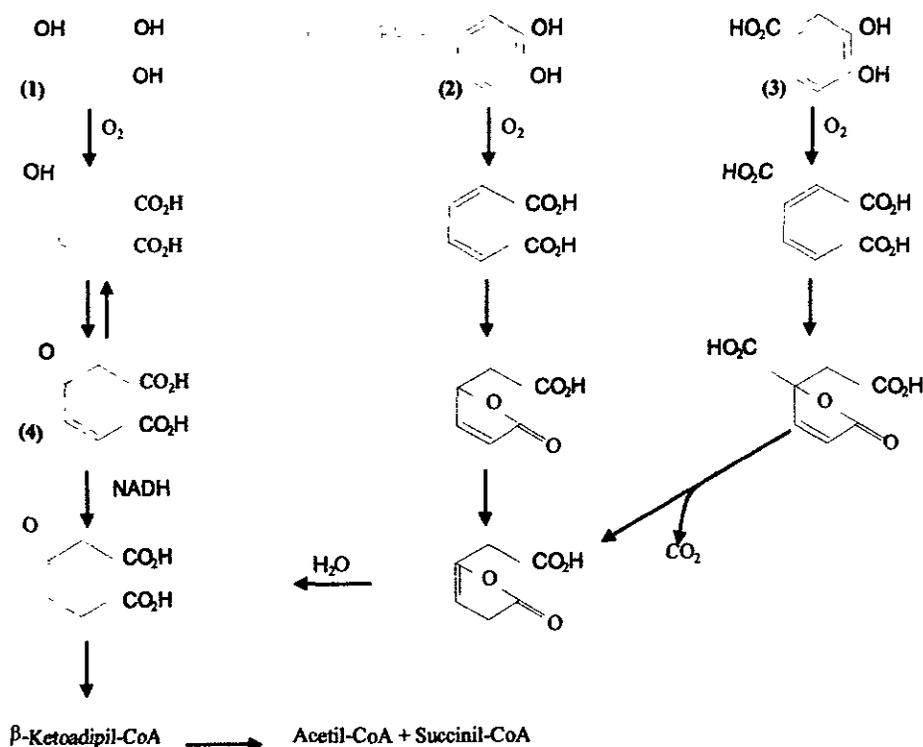


Fig. No. X-5.- Ruta de ruptura *orto* de transformación de los compuestos hidroquinol (1), catecol (2) y ácido protocatequico (3) para generar la acetil-CoA y succinil CoA.

Gran número de compuestos derivados del benceno se transforman por la principal ruta bacteriana rindiendo dihidrofenoles; en algunas ocasiones, los productos de transformación no poseen los dos grupos hidroxilo requeridos para la ruptura y en tales casos, el punto de ruptura de anillo se puede generar por la acción de una enzima hidrolasa de tipo flavoproteína que generalmente tiene una especificidad por cierto sustrato, pudiendo seleccionar entre una ruta metabólica y otra; esta selección está enfatizada por los mecanismos de depresión enzimática; por ejemplo cuando *Acinetobacter sp.* crece en 4-hidroxibenzoato la enzima 3-hidroxilasa se suprime y el sustrato de crecimiento se metaboliza por la ruta del compuesto homoprotocatequico, pero cuando crece sobre 3-hidrobenceno, la enzima 6-hidrolasa para este sustrato se suprime al igual que todas las enzimas para la ruta del gentisato.

Ahora bien, aunque las bacterias no se pueden dividir en categorías de ruptura del anillo en posiciones *meta* u *orto*, puede hacerse una diferenciación haciéndolas crecer en diferentes sustratos selectivos por ejemplo, la cepa *Pseudomonas putida* tiene un excelente desarrollo solo en 4-hidrobenceno y de manera similar, puede decirse lo mismo para los microorganismos fluorescentes que utilizan la ruptura en la posición *orto* específicamente para la ruta de los ácidos protocatequicos, mientras que los organismos no fluorescentes utilizan la ruta de ruptura en *meta* (Dagley, 1994).

10.3. TRANSFORMACIÓN DE BIFENILOS

Gran variedad de microorganismos, en condiciones aerobias son capaces de romper al menos uno de los anillos aromáticos por varias rutas metabólicas. En todas las rutas se requiere de oxígeno para la hidrólisis biológica del bifenilo. En la ruptura del anillo se hayan implicadas enzimas mono y dioxigenasas que catalizan la incorporación de oxígeno molecular a partir de los átomos de carbono en las moléculas de sustrato.

Lunt y Evans (1970) han descrito un grupo de bacterias Gram negativas capaces de oxidar el bifenilo a ácido fenilpiruvato y entre los trabajos más relevantes se encuentran, los realizados con la cepa *Pseudomona putida* que metaboliza bifenilos a ácidos benzoicos vía 2,3-dihidro-2',3'-dihidroxibifenilo, 2,3-dihidroxibifenilo, y ácido 2-hidroxi-6-oxo-fenilhexa-2,4dienoico (Catelani et. al., 1971 y 1973). En la misma línea de investigación, los trabajos de Gibson et. al., (1973) proporcionaron la evidencias para dilucidar el ataque inicial oxidativo en la posiciones 2,3 de la molécula del bifenilo.

Los resultados de los estudios de Catelani et. al (1971), sobre el metabolismo del bifenilo con *Pseudomona putida* son diferente a los de la ruta propuesta por Lunt y Evans (1970) y aunque los compuestos intermedios fueron los mismos, Catelani encontró ácido benzóico en lugar del ácido fenilpirúvico. Por otro lado, una especie de *Beijerinckia* metaboliza el bifenilo a 1(*cis*-2,3-dihidroxifenil)-2,4-hexadieno. (*cis*-2,3-dihidroxi-2'.3'-dihidroxibifenilo).

Ahora bien, la forma más segura y efectiva de eliminar halógeno de un producto de ruptura del anillo es por el ataque interno nucleofílico que forma el nuevo anillo. Las reacciones de este tipo se catalizan por enzimas lactonizantes en fisiones secuenciales de las posiciones *orto*. La lactonización, es en realidad utilizada para eliminar iones cloro en la transformación bacteriana del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Sin embargo, esta eliminación no es fortuita debido a que la enzima lactonizante (una cicloisomerasa) no es la misma utilizada en la ruptura *orto* del catecol; además, también se forma un tipo diferente de lactona que tiene un doble enlace (figura X-6).

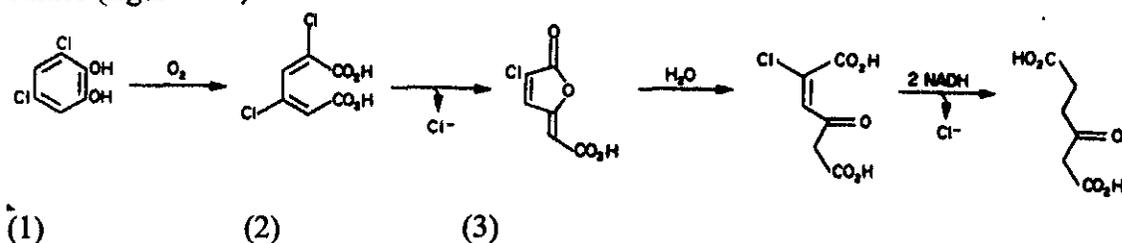


Fig. No. X-6.- Degradación bacteriana del 3,5-diclorocatecol. El anillo de este compuesto es un catabolito del ácido 2,4-diclorofenoxiacético que se abre por ruptura en posición *orto* con eliminación de cloro en la lactonización. La lactona (1) se hidroliza a ácido 2-cloromaleico (2) del cual se elimina un ión cloro durante la reducción hasta ácido β -cetoadípico (3) que posteriormente se metaboliza (Catelani, 1971).

10.4. TRANSFORMACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS

La hidroxilación y rompimiento del anillo es el principal mecanismo de transformación biológica de los BPCs; la transformación de mono- y dicloro bifenilos por *Achromobacter sp.*

produce ácido *para*-clorobenzóico (Ahmed y Focht, 1973) y la transformación del 4-clorobifenilo por bacterias Gram negativas en presencia de nitrato produce compuestos como el 2- y 4-hidroxi-4'-clorobifenilo además del 2- y 4-hidroximononitro-4'-clorobifenilo (Sylvestre y Fauteux, 1982). En la ruta para la formación de estos compuestos (figura X-7) el mecanismo propuesto, involucra la formación de un epóxido de areno intermedio el cual tiene gran reactividad con las enzimas biológicas.

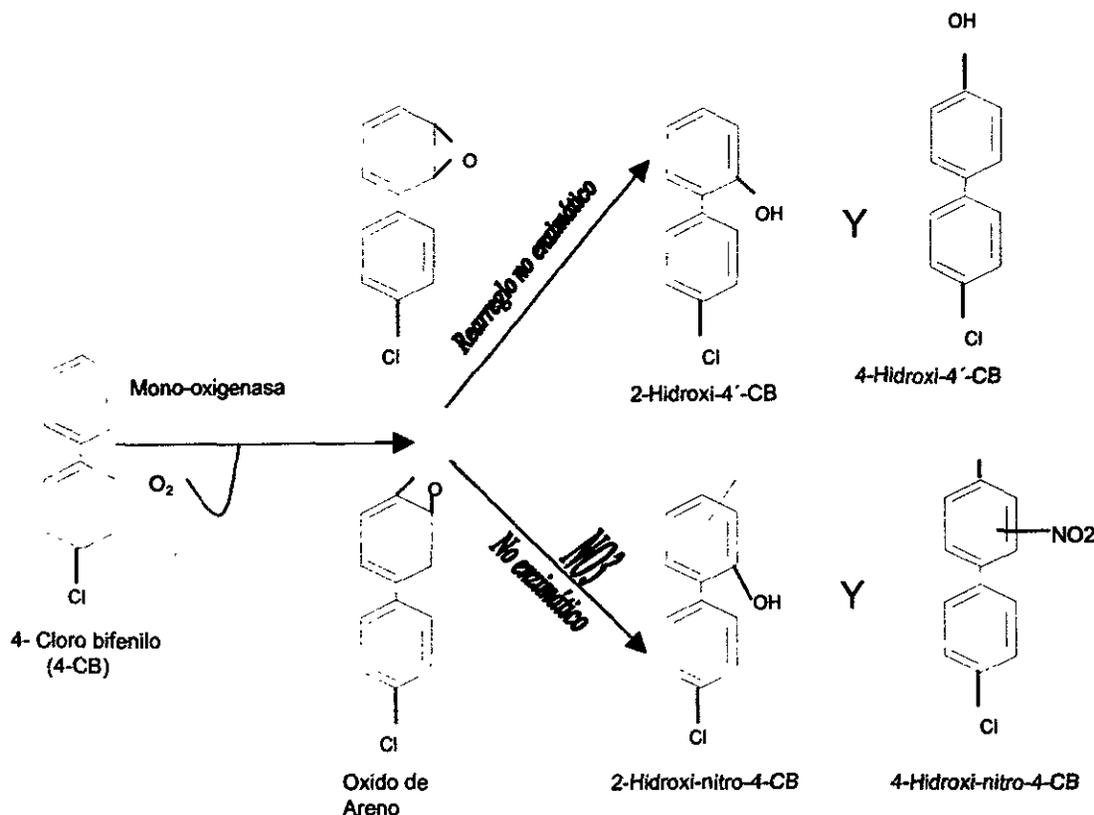


Fig. No. X-7.- Biodegradación del 4-cloro bifenilo por una bacteria Gram negativa en presencia de nitrato (Sylvestre, 1982).

Los estudios de Kaiser y Wong (1974), han demostrado que durante la transformación del Aroclor 1242 por bacterias los metabolitos principales fueron hidrocarburos aromáticos y alifáticos, ninguno de los cuales contenía cloro y la dechloración tenía lugar en un estado inicial del metabolismo. Los estudios de Carey y Harvey (1978), utilizando cultivos mixtos aislados de ambientes marinos demostraron ser capaces de metabolizar isómeros puros de tri- y tetrabifenilos y ciertas mezclas del Aroclor® 1254 con ácidos lactónicos como metabolitos intermedios.

Por otra parte Ohmori et. al., (1973), ha demostrado la existencia del ácido 4-clorobenzóico formado a partir de la transformación bacteriana del *para*-clorobifenilo denotando que cuantas más sustituciones de cloro existan, particularmente en las posiciones *orto*, se tienden

a retardar la transformación; no sólo debido al impedimento estérico de la hidroxilación, sino también, por las especies de oxígeno enzimáticamente desactivadas para la hidroxilación electrofílica; por lo cual, es de esperarse que la eliminación electrónica de los sustituyentes cloros desactiven el sustrato.

Existen además gran variedad de compuestos alquenos y alquilbencenos productos de la transformación de las mezclas comerciales de BPCs realizadas por diferentes bacterias de estuarios (Kaiser, 1974).

La degradación de BPCs bajo condiciones anaerobias, se realiza principalmente por deshalogenación con formación de halobenzoatos, dando por resultado $\text{CH}_4 + \text{CO}_2$ (Suflita et. al, 1982) por varias rutas, muchas de las cuales no se conocen del todo por estar influenciadas por diferentes condiciones ambientales.

10.4.1. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN DE BPCs

Las enzimas empleadas en la transformación de las moléculas de BPCs, son altamente específicas tanto en la reacción que catalizan, como en los sitios de unión al sustrato, acelerando las reacciones y disminuyendo la energía de activación de Gibbs (ΔG) por medio del incremento de la tasa de reacción o bien, estabilizando los estados de transición energética. Existen dos factores a tomar en cuenta para la transformación de los bifenilos policlorados:

- La influencia de los factores de configuración del congénere a degradar ya que en ella interviene el efecto de estereoselectividad de la enzima por el sustrato y
- Los factores de conformación del congénere, ya que puede provocar impedimentos a la acción de la enzima.

El conocimiento de las características electrostáticas del compuesto, son de gran importancia en los mecanismos de ruptura de los anillos aromáticos y en la formación de los enlaces covalentes característicos de una reacción de biotransformación debido a que pueden influir en los sitios de unión de la enzima al sustrato; por ejemplo, en la biotransformación de los anillos bencénicos, los compuestos benceno dihidrodiol, son metabolitos producidos por el ataque de agua en un epóxido de areno catalizado por una enzima hidrolasa epóxida; el compuesto así formado, puede ser deshidrogenado a su vez por una enzima dihidrodiol dihidrogenasa para rendir el correspondiente catecol; el mecanismo de reacción es una oxidación en uno de los grupos hidroxilos para rendir un compuesto cetol el cual posteriormente enoliza al catecol.

La oxidación por atracción de electrones sin incorporación de oxígeno es otro mecanismo característico de algunas enzimas oxidorreductasas y algunas citocromos P_{450} , pero la reacción más importante de oxidación en el metabolismo de los compuestos aromáticos es la incorporación de oxígeno en el sustrato, reacción característica de las enzimas oxigenasas, que bien pueden ser mono o dioxigenasas dependiendo de la transferencia de uno o dos átomos de oxígeno al sustrato.

Así mismo, las reacciones de monooxigenación pueden llevarse a cabo por enzimas del grupo de los citocromos codificadas por el gen P_{450} con grupos hem, o bien, flavinas

monooxidasas contenidas en las flavoproteínas que tienen la capacidad de reducir el sustrato durante el metabolismo de los compuestos aromáticos: Existen además, otros tipo de enzimas monooxigenasas que contienen cobre, capaces de metabolizar gran variedad de compuestos organoclorados.

Sin embargo, la degradación de los BPCs puede ser inhibida por mecanismos de represión enzimática (Dolfing y Tiedje, 1991). Bajo condiciones anaerobias Suflita et. al. (1983) ha demostrado que el diclorobenzoato actúa como un inhibidor competitivo de la deshalogenación debido al cambio o transporte del sitio activo necesario para las enzimas.

10.4.2. RUTAS DE TRANSFORMACIÓN BIOLÓGICA

En la biodegradación de los bifenilos policlorados, las enzimas dioxigenasas son las encargadas de realizar la degradación generando benzoatos y cloro benzoatos como los productos principales de la acción enzimática sobre los anillos y sobre las cuales actúan a su vez, enzimas benzoato dioxigenasas de manera secuencial generando compuestos de fácil degradación; por ejemplo, los patrones de las rutas de transformación metabólica de las bacterias indican que los bifenilos policlorados están sujetos al ataque de enzimas dioxigenasas para formar compuestos dihidrodiol (2,3-dihidroxi-1-fenilciclohexa-4,6-dieno) de estereoquímica *cis*.

La deshidrogenación rinde el 2,3-dihidroxi bifenilo (2,3-HB) el cual se rompe en la posición *meta* similar a los descritos para los compuestos metilcatecol (Bayley y Dagley, 1969; DeFrank y Ribbons, 1977) hasta generar un compuesto amarillo, el ácido 2-hidroxi-6-cetofenoxihexa-2,4-dienoico, el cual es convertido a ácido benzoico y un fragmento de cuatro carbonos, conocido como ácido 2-ceto-4-pentanoico.

Ahora bien, la formación de BPCs hidroxilados y cloro benzoatos está dada por dos diferentes formas de acción de las enzimas 2,3 y 3,4-dioxigenasas (Bedard, 1990; Furukawa et. al., 1979; Nadim et. al, 1988; Masse et. al., 1985) como se ha propuesto para la mineralización a partir de los estudios del 4-clorobifenilo (Shields et. al., 1985).

Se ha propuesto también, otro mecanismos para remover los sutituyentes de los compuestos aromáticos como la deshalogenación fortuita por enzimas dioxigenasas como se ha sugerido en la mineralización del 2-clorobenzoato por *Pseudomona cepacia* (Zaitsev y Karasevich, 1982).

Por otro lado, Safe, (1985) ha reportado que los congéneres de BPCs sustituidos en dos posiciones *meta* y *para* y no más de una posición *orto* son los más efectivos inductores de la acción del citocromo P₄₄₈-dependiente de monooxigenasas. Existen además, otras enzimas como los citocromo P₄₅₀ (hemoproteína que se encuentra en las membranas celulares de bacterias, hongos, plantas y animales) capaces de utilizar BPCs, anilina y benceno como sustrato (Testa, 1995).

La ruta más común propuesta para la transformación de los BPCs estudiada en cepas de *Pseudomonas sp.* B13 está basada en la detección de metabolitos acumulados como los encontrados en la transformación del bifenilo con la correspondiente formación de compuestos

cis-dihidrodiol, el cual es a su vez deshidrogenado para rendir un bifenilo 2',3'-dihidroxi; el rompimiento en la posición *meta* genera derivados clorados como el 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoatos, que se metabolizan posteriormente rindiendo cloro benzoatos y 2-hidroxipenta-2,4- dienoatos. La secuencia de la reacción involucra la conversión de los clorobenzoatos a sus respectivos compuestos catecol que procede según la vía de sustitución de cloros por grupos OH con formación de compuestos 1,2-dihidroxi-1,2-dihidroxibenzoato como intermedios.

10.4.2.1 PRODUCTOS METABÓLICOS

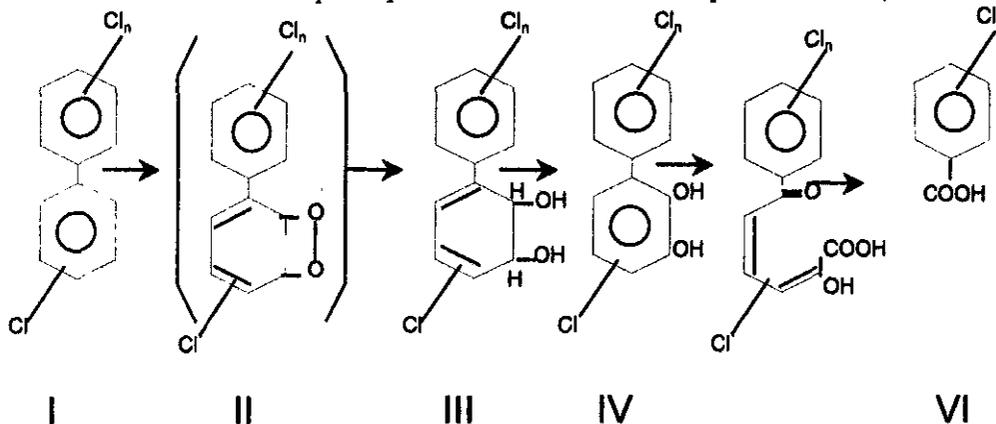
Estudios realizados por Furukawa (1979) sobre los productos metabólicos de la biodegradación de 36 congéneres de BPC puros (desde mono- hasta penta clorados) han demostrado que 33 de ellos, fueron degradados por *Acinetobacter sp.* formando ácidos clorobenzoicos como metabolitos intermedios por la vía de las enzimas oxigenasas (Tabla X-1).

Grupo	Productos	Posiciones
I	Ac. Clorobenzoico (Cl no. 1-4)	2-, 3-, 4-, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 3,4-, 3,5-, 2,2'-, 3,3'-, 4,4'-, 2,3,4-, 2,4,5-, 2,5,2'-, 3,4,2'-, 2,3,4,5-2,4,2',4'-, 3,4,3',4'-,
II	Compuesto de ruptura en <i>meta</i>	2,4'-, 2,4,4'-, 2,5,4'-,
III	Compuestos dihidroxi	2,6-, 2,3,6-, 2,4,2',5'-, 2,4,5,2',5'-,
IV	Compuesto trihidroxi	2,4,6-,
V	Compuestos no identificados	2,3,2',3'-, 2,3,2',5'-, 2,4,5,2',3'-,
VI	Sin metabolitos	2,3,5,6-, 2,6,2',6'-,

Tabla No. X-1.- Productos metabólicos de los congéneres de BPCs biodegradados por *Acinetobacter sp.* (Furukawa et. al., 1979).

Esto sugiere que un peróxido cíclico es el producto de oxidación inicial en el metabolismo del bifenilo que se inicia cuando dos átomos de oxígeno molecular se incorporan en las posiciones 2,3 de un bifenilo monoclorado o del anillo menos clorado de la molécula de BPC para formar el compuesto *cis*-dihidrodiol (Sección III en la (figura X-8) que es deshidrogenado hasta rendir compuestos 2,3-dihidroxi (IV).

Fig. No. X-8.- Ruta metabólica principal de los BPCs realizada por bacterias (Furukawa et.al.,1980)



El rompimiento del anillo ocurre entre los carbonos 1 y 2 del compuesto 2,3-dihidroxi para formar su derivado clorado, el 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dionato (V). En algunos congéneres de BPCs el compuesto de rompimiento en *meta* así formado se hidroliza rápidamente hasta ácido benzóico (VI).

En el mismo experimento anterior de los 36 BPCs, 18 congéneres se transformaron a sus correspondientes ácidos benzóicos por la ruta mayor en *Acinetobacter sp.*; esta ruta de oxidación hasta clorobenzoato, es también común a otras cepas puras de *Alcaligenes sp.* (Furukawa et. al., 1976 y 1979) *Achromobacter sp.* (Ahmed y Focht, 1973) y *Pseudomonas putida* (Catelani et. al., 1971 y 1973; Ballsmiter et. al., 1977) que degradan tanto congéneres puros como mezclas comerciales en ambientes naturales (Furukawa et. al., 1980).

Se ha demostrado también, un patrón alternativo a la reducción a clorobenzoato con otros congéneres por ejemplo, en los congéneres 2,4'-, 2,4,4'- y 2,5,4'- todos poseen átomos de cloro en las posiciones 2,4'- y se convierten rápidamente en compuestos de ruptura en *meta* a través del patrón mayor ilustrado en la tabla anterior. Estos compuestos, son muy estables y se acumulan en la mezcla de la reacción. Los compuestos dihidroxi se acumulan también en las mezclas de reacción a partir de los congéneres 2,6-, 2,3,6-, 2,4,2',5'-, 2,5,2',5'-, y 2,4,5,2'-. De igual forma, el 2,4,6-triclorobifenilo se metaboliza rápidamente a compuestos tri-hidroxi por la vía de los compuestos dihidroxi y posteriormente los compuestos tri-hidroxi se acumulan durante la última fase de incubación en el medio.

Los BPCs que poseen átomos de cloro en las posiciones 2,3 así como los congéneres 2,3,2',3'-, 2,3,2',5', y 2,4,5,2',3'- se metabolizan por una ruta alternativa. Existen además, gran acumulación de otros subproductos no identificados en el medio, que también se han reportado en la biotransformación de las mezclas comerciales del Kaneclor® 400 (Furukawa et. al., 1980).

Los hongos y levaduras metabolizan bifenilos y clorobifenilos de bajo número de cloros a compuestos hidroxi y dihidroxi similares a los de los sistemas enzimáticos de los mamíferos (Cerniglia et. al., 1980); pero los patrones de ruptura del anillo, son diferentes al de las bacterias. Los estudios de Smith y Rosazza (1974), han demostrado que varios géneros y especies de hongos son capaces de crecer en bifenilo y formar 2- y 4-hidroxibifenilos y 4,4'-, 2,4'-, y 2,5-dihidroxibifenilos. De igual manera, Walnöffler et. al. (1973), ha demostrado que *Rhizopus japonicus* convierte el 4-clorobifenilo a 4-hidroxibifenilo.

Existen cuatro mecanismos propuestos para la hidroxilación de aromáticos: la abstracción, la adición directa, la inserción y la adición con rearrreglo (Tomaszewski et. al., 1975). El mecanismo de abstracción no es muy aceptado por razones energéticas y por que trabajando con H marcado, éste se retiene en los productos hidroxilados. La ruta de adición directa parecer ser la más aplicable en la hidroxilación de los BPCs debido a que: I) se han aislado óxidos de arenos e dihidrodioles a partir de incubaciones microsomales (Gardner et. al., 1973; Fargue y Allen, 1982); II) se ha demostrado la eliminación de cloro con alta retención del deuterio (Sundtrom y Slocumb, 1976; Safe, 1985) y III) no se demostró ningún efecto isotópico. La ruta de inserción directa parece explicar sólo la *meta*-hidroxilación debido a los efectos isotópicos demostrados en el bifenilo, nitrobifenilo y metilfenilsulfonato. La ruta de adición con arreglo se excluye frecuentemente debido a sus grandes requerimientos energéticos para demostrar un efecto

isotópico para la hidroxilación en posición *meta* (Tomaszewski et. al., 1975 y Billings y McMahon, 1978).

10.4.2.2. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN DE BENZOATOS

La enzima benzoato 1,2-dioxigenasa es específica para oxidar benzoatos y clorobenzoatos en posición *meta* (Reineke Knackmuss, 1978) lo que comprueba los estudios de Ichihara (1962) en *Pseudomonas aeruginosa* que acumula 3-clorocatecol a partir del 3-clorobenzoato. Sin embargo, existen otras enzimas que bajo ciertas circunstancias, son capaces de oxidar benzoatos con sustituyentes en posiciones *orto* y *para* como lo demuestran los estudios de Hovart y Alexander (1970), en *Arthrobacter sp* cuyas enzimas tienen diferente regioselectividad de dioxigenación, en las posiciones 1,6 dando como resultado compuestos 4-clorocatecol a partir del 3-clorobenzoato.

Ahora bien, los compuestos clorocatecol pueden ser fácilmente metabolizados a cloro *cis*-muconatos como lo demuestra la actividad enzimática del 3,5-cloro catecol por las vías: a) 2,4-dicloromuconato; b) *trans*-2-cloro-4-carboximetilenbuta-2 en 4 olide; c) *cis*-2-cloro-4-carboximetilenbuta-2-en 4-olide; d) β -clorometilacetato y e) maleilacetato (Schmidt et. al., 1980; Schwien, 1984). De igual forma, una enzima aislada de *Arthrobacter sp* cataliza la conversión del 4-cloro- y 3,5-diclorocatecol a 3-cloro- y 2,4-dicloro-*cis*-muconato respectivamente (Tiedje et. al., 1969).

10.4.2.3. METABOLISMO DE BPCs EN MAMÍFEROS

Aunque los detalles del mecanismo de hidroxilación de los BPCs no se conocen del todo, se han propuesto varias rutas de hidroxilación de la molécula de BPC detectados en los metabolitos de ciertos mamíferos; en ellos, la hidroxilación se realiza por un sistema hepáticoenzimático de citocromos P₄₅₀ dependiente de NADPH y oxígeno; y P₄₅₀ dependiente de Fenobarbital y β -naftoflavona.

El primer sistema, metaboliza preferentemente diclorobifenilos de conformación coplanar y el segundo solo BPCs no coplanares (Grant et. al., 1971; Kennedy et. al., 1980 y 1981; Kaminsky et. al., 1982; Gardner et. al., 1973). Por ejemplo, en la ruta metabólica del 4,4'-diclorobifenilo, los metabolitos generados poseen gran cantidad de compuestos hidroxilados como el 4,4'-dicloro-3-hidroxi-bifenilo formado a partir de un rearrreglo de un compuesto cetoenolico intermedio o del 3,4-epóxido con pequeñas cantidades de 3,4'-dicloro-4-hidroxi-bifenilo, cuya presencia supone la formación de un óxido de arena como un compuesto intermedio en el metabolismo de los BPCs; además de compuestos 4'-cloro-4-hidroxi-bifenilo; 4'-cloro-3-hidroxi-bifenilo; 4,4'-dicloro-2-hidroxi-bifenilo y un metabolito dihidroxilado, conocido como 4,4'-dicloro-3,3'-dihidroxi-bifenilo que resulta del reciclaje de los metabolitos primarios a través del sistema de citocromos P₄₅₀.

Estos estudios, también demuestran la pérdida de cloros durante el metabolismo y aunque el mecanismo no ha sido aun explicado, se piensa que la pérdida puede ocurrir durante el rearrreglo del 3,4-epóxido (Schellmann et. al., 1984). Resultados similares se reportaron en estudios realizados sobre los patrones de hidroxilación de hexaclorobifenilos. La formación de óxidos del areno como un compuesto intermedio en el metabolismo de BPCs es una evidencia de este mecanismo, (Safe et. al., 1987) pero existen evidencias de que los BPCs pueden ser también metabolizados por un mecanismo con formación de compuestos de naturaleza clorofenólica en los que no intervienen óxidos de areno (Slander et. al. , 1975^a y 1975^b; Preston et. al., 1983).

10.5. BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS NITROAROMÁTICOS

Gran parte de la literatura sobre la degradación de compuestos nitroaromáticos se ha centrado principalmente en compuestos explosivos como el trinitrotolueno (TNT) (Kaplan, 1990; Hallas, 1983). En la transformación aerobia de compuestos mononitro fenólicos el sistema de anillos se oxida mediante enzimas mono y dioxigenasas, rindiendo nitritos y compuestos catecol que experimentan la ruptura del anillo por una ruta oxidativa. Las reacciones de biotransformación de los compuestos involucran en una primera fase, la inserción o modificación de un grupo funcional en la molécula de sustrato por ejemplo un grupo nitro (NO_2^-) que se puede reducir a grupo amino ($-\text{NH}_2$); la segunda fase, involucra la conjugación de una molécula o fragmento endógeno al sustrato, rindiendo un metabolito conocido como conjugado; de tal manera que el grupo $-\text{NH}_2$ puede convertirse en acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$) en la conjugación con una mitad acetilo (Spain y Gibson, 1991).

La importancia de este tipo de reacciones de oxido-reducción es la formación de compuesto intermedios electrófilos, generalmente cationes y/o radicales (en la oxidación) mientras que la reducción permite la formación de radicales nucleofílicos. La relación entre estos parámetros permiten establecer las características de selectividad y especificidad de las enzimas que actúan en el proceso.

La eliminación del nitrógeno desde el punto de vista biológico, puede realizarse por la vía de síntesis bacteriana aerobia o anaerobia o bien la desnitrificación anóxica. El nitrógeno en su forma reducida de ión amonio se oxida para producir energía en tanto que el nitrógeno en forma de nitritos y nitratos se utiliza como fuente de oxígeno por microorganismos desnitrificantes. Ahora bien, la aminación de los anillos bencénicos proporciona la entrada para la biosíntesis de los aminoácidos en la síntesis proteica por la reducción a amonio. (Schlegel, 1975).

Muchos de los microorganismos desnitrificantes no sólo crecen utilizando el nitrato como aceptor de hidrógeno, sino también el nitrito e incluso algunos utilizan el peróxido de nitrógeno por lo que se infieren las enzimas nitrorreductasa desasimilatorias producidas por éstos. Este mecanismo tiene conexión con la cadena respiratoria llegándose incluso a considerar que los procesos de reducción se encuentran unidos con el proceso de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, existen muchos microorganismos desnitrificantes que sólo utilizan el nitrato como aceptor de hidrógeno pero son incapaces de reducirlo a NH_4^+ por otra parte, en algunos microorganismos las enzimas nitrorreductasas además de reducir el nitrato también reducen cloratos y percloratos si los hubiere (Schlegel, 1975).

Se ha aceptado generalmente que la biodegradación de los compuestos nitroaromáticos puede realizarse por una vía de las dos rutas: la oxidación del anillo con eliminación del nitrito, o la reducción del grupo nitro para obtener la correspondiente amina.

0.5.1. REDUCCIÓN DEL GRUPO NITRO

Los primeros estudios de Hallas y Alexander (1983), han demostrado que la transformación anaerobia de varios compuestos nitroaromáticos se realiza principalmente por la reducción del grupo nitro como el mayor mecanismo de transformación del compuesto; tanto en condiciones aerobias como anaerobias, la reducción se realiza por medio de enzimas reductasas que catalizan la reducción de los nitrobenzoatos a hidroxilamino benzoatos.

La reducción del grupo nitro puede ocurrir bajo la transferencia de dos electrones que rinden derivados nitroso, amino e hidroxilamino o bien, a través de la transferencia de un solo electrón que da por resultado compuestos nitrosos y nitroaniónicos (Cerniglia y Somerville, 1995). La mayoría de los estudios demuestran que bajo condiciones anaerobias, el primer paso es la transformación de los grupos amino a hidroxilamino y después a sustituyentes amino tanto en los sistemas procariotas como en los mamíferos.

Gran variedad de enzimas encontradas en células procariotas y eucariotas pueden catalizar la reducción del grupo nitro de los compuestos aromáticos. Aunque estas enzimas poseen pocas características en común, pueden ser agrupadas en uno de los dos tipos funcionales basados en su habilidad para catalizar la nitrorreducción en presencia de oxígeno. Las enzimas de tipo I (no sensibles al oxígeno) reducen el grupo nitro por la vía de incrementos de dos electrones con formación de compuestos nitroso e hidroxilamino como intermedios. Se han purificado a partir de *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, enzimas nitrorreductasas insensibles al oxígeno que degradan el nitrobenzoceno por la vía hidroxilamino benzoceno pero sin producción de anilina.

Las enzimas de tipo II (sensibles al oxígeno) catalizan la reducción de un electrón del grupo nitro para rendir un anión nitro, que reacciona con el oxígeno para formar un radical superóxido y regenerar el nitro compuesto. La reducción de los grupos nitro no es probablemente la principal función fisiológica de esas enzimas pero las características intrínsecas del grupo nitro, lo hace atractivo como un fácil aceptor de electrones (Cerniglia y Somerville, 1995).

Crawford (1995) ha estudiado la reducción del grupo nitro del ácido nitrobenzoico con enzimas extraídas de *Nocardia erythropolis*; la detección de derivados nitroso e hidroxilaminos del nitrobenzoato, indican que éstos también son compuestos intermedios en la reducción de aminobenzoatos. Este estudio, atribuye una actividad nitrorreductasa a una metalo-flavoproteína soluble que cataliza la reducción completa del grupo nitro a grupo amino. Sin embargo, existen bacterias que creciendo en glucosa reducen compuestos nitrobenzoatos a aminobenzoatos, lo cual sugiere que la reacción no es catalizada por una enzima nitrorreductasa específica inducible (Cerniglia y Somerville, 1995).

Se ha comprobado también la reducción de nitrobenzoatos a aminobenzoatos por medio de una enzima NADH-dependiente extraída de las cepas *Nocardia sp.* y *Pseudomonas fluorescens* (Furukawa y Chakrabarty, 1982). La cepa *Veillonella alcalescens* posee una enzima capaz de reducir 30 compuestos mono, di- y trinitroaromáticos en un proceso de tres pasos por la vía R-NO

y R-HOH (Cartwright, 1995). De igual manera, Bielaszczyk et. al., (1967), ha demostrado la reducción aerobia del 4-cloronitrobenzoceno por *Arthrobacter sp.* en suelos contaminados. En la misma línea de trabajo Corbett et. al., (1981), ha informado la reducción del 4-cloronitrobenzoceno por una ruta reductiva hasta obtener 4-cloroanilina en la cual la hidroxilamina intermedia experimenta un arreglo Bamberger en la que el grupo hidroxilo migra del nitrógeno al carbono generando los compuestos 2-amino-5-clorofenol y 4-aminofenol por los ataques en las posiciones *orto* y *para* del anillo respectivamente; se ha reportado también la acetilación de este tipo de compuesto sin formación de derivados azo o azoxy.

Por otro parte, por lo estudios de Russel (1980), han demostrado la reducción del 4-cloronitrobenzoceno utilizando la cepa *Acetobacter agilis*; en esta reducción, el grupo amino esta sujeto a acetilación o propionilación. En estudios realizados en *Mucor javanicus* se ha informado también el desplazamiento no usual del cloro a la posición *para* por un grupo metilo en el 2,4-diclorobenzoceno (Tahara et. al., 1981).

De igual manera Chacko et. al. (1966), ha informado la reducción del penta cloro nitrobenzoceno por la cepa *Streptomyces aureofaciens*. Masse et. al. (1985), ha observado el crecimiento de una bacteria Gram-Negativa B206 en 4- nitrobifenilo y Takase et. al. (1986), ha demostrado el crecimiento de *Pseudomona cruciviae* S93B1 en 2- y 3-nitrobifenilo, en ambos casos existió acumulación de nitrobenzoatos como metabolitos en el cultivo.

Hallas y Alexander (1983), han reportado la reducción de compuestos nitro- y di-nitrobenzenos, nitrotoluenos y nitrobenzoatos en efluentes de aguas residuales tanto en condiciones aerobias como anaerobias con formación de compuestos acetamida y 2-metilquinolina como intermedios de la anilina y el compuesto 2-metilbencenimidazol como intermedio de la 2-nitroanilina. Se ha estudiado también el metabolismo del 2- aminobenzoato utilizando cepas de *Pseudomona desnitrificans* en presencia de nitrato; en este proceso, el benzoato y el 2-aminobenzoato son oxidados en condiciones anaerobias hasta CO₂ con la consecuente reducción del NO₃⁻ a NO₂⁻. Una observación importante fue que sólo después de haber consumido todo el nitrato, el nitrito fue reducido a N₂ gas.

Crawford (1995), ha presentado un nueva ruta alternativa en *Clostridium sp.* para la transformación de compuesto nitroaromáticos que involucra la reducción a aminoaromáticos que posteriormente son desplazados por medio de reacciones hidrolíticas para formar polifenoles. Los cuales son reductivamente deshidroxilados hasta rendir fenoles sencillos de fácil metabolización.

En los mamíferos la conversión de los compuestos derivados del nitrógeno se lleva a cabo por enzimas citocromo P₄₅₀ reductasas de manera similar, a las enzimas nitroreductasas bacteriales que reducen compuestos nitroaromáticos (Mermelstein et. al., 1981).

10.5.2. ELIMINACIÓN DEL GRUPO NITRO

El estudio de la transformación de los compuestos aromáticos nitrados estuvo por mucho tiempo limitada a la reducción del grupo nitro y formación de derivados azoxy; sin embargo,

existe otra forma de transformación de compuestos nitroaromáticos por microorganismos que se lleva a cabo mediante la eliminación del grupo nitro por medio de dos sistemas enzimáticos; el primero utiliza enzimas nitrorreductasas generando una amina y amonio; en el segundo, el nitrito se libera en una reacción oxidativa como sucede en *Pseudomonas putida* que utiliza 2-nitrofenol con eliminación del grupo amonio (Zeyer y Kearney, 1984).

Los estudios de Moore (1969), fueron los primeros en describir el crecimiento de *Nocardia sp.* en nitrobenzono y anilina como únicas fuentes de nitrógeno y carbono; pero recientemente, se han identificado organismos capaces de utilizar gran variedad de compuestos aromáticos nitrados como única fuente de carbono y nitrógeno (Higson, 1992^a).

Cain (1966), ha reportado la degradación de nitrobenzoatos por *Nocardia opaca* que crece en 2-nitrobenzoato. Las cepas *N. erythropolis* y *Camomonas acidovorans* crecen en 4-nitrobenzoato como únicas fuentes de nitrógeno y carbono con formación de compuestos nitrocatecol; estas cepas además, son inductoras de la oxidación del ácido protocatequico en el que el grupo nitro es reemplazado por grupos hidroxilos o bien ocasionalmente, el 4-nitrobenzoato puede reaccionar con una enzima dioxigenasa para producir un compuesto nitrocatecol.

Se ha propuesto también, la degradación de compuestos haloaromáticos a partir de una ruta de transformación de clorobenzoatos en *Pseudomonas sp.* N31 en combinación con una enzima oxigenasa que permite al microorganismo utilizar 4-cloro 2-nitrofenol como única fuente de nitrógeno por liberación de nitrito (Bruhn et. al., 1988). De igual forma, se ha informado la ruta de transformación del nitrocatecol en *Pseudomonas putida* (Zeyer y Kearney, 1983) y *Nocardia sp.* (Bachofer et. al., 1975) creciendo en 4-nitroanilina como única fuente de carbono con formación de compuestos catecol. Por otra parte, Reber et. al. (1979) ha informado la transformación de la 3-cloroanilina, la cual se convierte a 4-clorocatecol por *Pseudomonas multivorans* y *Alcaligenes fecalis* (Surovtseva et. al., 1980).

Los compuestos aromáticos conteniendo sólo un grupo funcional nitro y un sustituyente activador, como por ejemplo un grupo hidroxilo o un carboxilo, son más fácilmente transformados por los microorganismos del suelo, en comparación con los compuestos sustituidos con impedimentos estéricos y/o desactivación electroquímica los cuales son más difíciles de degradar por oxidación bacteriana (Higson, 1992^b).

Aunque la degradación de los compuestos nitroaromáticos metabolizadas por enzimas peroxidasas no ha sido estudiada en detalle, existe información que infiere que en tales reacciones, pueden intervenir diferentes enzimas por ejemplo, el hongo *Phanerochaete chrysosporium* creciendo bajo limitadas condiciones de nutrientes (principalmente carbón, nitrógeno y azufre) secreta enzimas y factores que en conjunto, constituyen el sistema de degradación de la lignina. Este sistema contiene las principales enzimas responsables para la biotransformación de varios tipos de compuestos xenobióticos a dióxido de carbono e incluso, ha probado ser eficaz en la biodegradación de compuestos nitroaromáticos. Los componentes de este sistema enzimático, incluyen enzimas peroxidasas dependientes de lignina y peroxidasas dependientes del manganeso, además de oxidasas, reductasas, peróxido de hidrógeno, alcohol veratryl, oxalatos y quinonas; Incluso, se ha sugerido la existencia de enzimas nitrorreductasas intracelulares que se utilizan también en la degradación de los compuestos nitroaromáticos (Sthall y Aust, 1995).

Aunque la sustitución múltiple del anillo (trinitrado) presenta impedimentos estéricos y reduce la densidad electrónica del anillo aromático impidiendo el ataque electrofílico de las enzimas dioxigenasas; los estudios de Fernando et. al. (1990), han demostrado que estos pueden ser degradados por enzimas peroxidasas producidas por *Phanerochaete chrysosporium*.

Esta sección presenta el marco de referencia que permite el estudio detallado de la ruptura de la molécula de BPC aminado. Por una parte, se ha demostrado que la ruptura del al menos uno de los anillos es imprescindible para poder afrontar las exigencias de fiabilidad de los procesos de biológicos para el tratamiento de BPC y por otra parte, se ha presentado una revisión histórica que es necesaria para comprender el contexto en que se ha desarrollado el presente trabajo.

El éxito de cada etapa en un proceso de biodegradación aerobio o anaerobio de BPCs en un reactor, depende de varios factores entre los que se encuentran, el tipo de biomasa, concentración en el biorreactor, diversidad de la población y especificidad enzimática de cada una de ellas; depende además, de la estructura del sustrato, grado de solubilidad, concentración y del control de los factores ambientalmente óptimos como el pH, temperatura, disponibilidad de aceptores de electrones, fuentes de carbono y el periodo de aclimatación de los microorganismos al sustrato; otro tipo de problema común al que hacer frente, es la producción de sustancias intermedias al medio que pueden llegar a inhibir la degradación del compuesto.

Actualmente, aunque se han podido aislar microorganismos únicos que son capaces de degradar BPCs, es necesario una asociación de diferentes cepas para llevar a cabo la degradación completa hasta su mineralización; ahora bien, mientras la degradación aerobia normalmente se lleva a cabo con múltiples microorganismos que trabajan más o menos de forma independiente y paralela, los microorganismos anaerobios viven en asociaciones donde distintas cepas son responsables de realizar pasos únicos en el proceso de biodegradación lo que ha proporcionado la pauta para el establecimiento de líneas de biodegradación utilizando diferentes trenes de tratamiento con reactores anaerobio-aerobio secuenciales en los cuales, los microorganismos con diferentes actividades enzimáticas realicen conjuntamente el metabolismo de los BPCs y los productos intermedios formados.

Capítulo XI.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO

11. METODOS DE TRATAMIENTO BIOLÓGICO

El objetivo principal del tratamiento biológico de los bifenilos policlorados es el de minimizar sus efectos al ambiente. La gestión y el tratamiento de los BPCs es actualmente un componente de todo sistema de eliminación de residuos peligrosos y para lograr su eliminación ambientalmente óptima, es indispensable aplicar tratamientos específicos. Las líneas de acción básicas para el control integral de los BPCs son actualmente los métodos de incineración, las plantas de tratamientos fisico-químicos de muy alto costo y los depósitos de seguridad (éste último ha sido prohibido por la nueva legislación ambiental).

Recientemente, los procesos biológicos empiezan a formar parte de una serie de tecnologías y bases científicas empleadas para la eliminación o estabilización de BPCs y otros residuos industriales; la eficacia de tales procesos biológicos consiste básicamente, en el control de los factores requeridos para el desarrollo de los microorganismos; en los últimos años, estos procesos han adquirido gran importancia debido a que ofrecen una mayor eficiencia de eliminación de contaminantes organoclorados a costos menores que los procesos fisicoquímicos, lo que ha favorecido el desarrollo de líneas de investigación en procesos biológicos y tecnologías avanzadas para conseguir un mayor rendimiento.

En el campo de investigación tecnológica actualmente se están dando novedades en la aplicación de biotratamientos con reactores aerobios y anaerobios utilizando microorganismos en cultivos mixtos; así como también, tratamientos de biorrestauración de suelos contaminados. Como resultado de estas investigaciones, se han desarrollado tecnologías innovadoras para tratar los BPCs y aunque hasta la fecha, los porcentajes de degradación de ambos procesos no han resuelto satisfactoriamente el problema, se siguen desarrollando planes integrales de biodegradación enfocados en optimizar el diseño de procesos aerobios y anaerobios evaluando cada etapa de forma aislada y como sistema integral.

Las peculiares propiedades fisicoquímicas de los BPCs los colocan entre los contaminantes más persistentes en el medio ambiente no obstante, existen dos tipos básicos de degradación microbiana de BPCs: la transformación aerobia, que es capaz de degradar solo BPCs con bajo contenido de cloros (desde mono- hasta tetra-clorados), y la degradación anaerobia que ocurre en sedimentos contaminados con BPCs (Lang, 1992) la cual se lleva a cabo por procesos naturales que permiten la dechloración reductiva de los congéneres más clorados de todas las mezclas comerciales de BPCs (Nies y Vogel, 1990). Los tratamientos de biodegradación con microorganismos aerobios, degradan el bifenilo oxidando y abriendo los anillos por medio de la acción de enzimas mono y dioxigenasas; el oxígeno molecular es esencial para que éstas enzimas funcionen cuando se incorporan a los productos de reacción (Evans, 1990); el clorobenzoato es el subproducto principal de estas reacciones, pero puede fácilmente biodegradarse por enzimas benzoato dioxigenasas con producción de benzoatos como los productos más estables de sus metabolitos. Además existen otros conjugados metabólicos como el ácido glicoxilclorobenzoico en combinación con clorobenzoato como los productos de la biodegradación del 2-clorobifenilo en ríos y estuarios contaminados (Kong y Saylor, 1983).

En el tratamiento con microorganismos anaerobios, los congéneres de BPCs más altamente clorados que incluyen todos aquellos farmacológicamente más tóxicos y persistentes para los animales superiores (Brown et. al., 1987) el anillo queda intacto mientras se remueve el cloro (Nies y Vogel, 1990); es decir, esta biotransformación reductiva convierte a los BPCs altamente clorados en congéneres menos clorados; por ejemplo, los congéneres *orto* sustituidos se convierten principalmente a congéneres mono y dicloro bifenilos, los cuales son menos tóxicos y más fácilmente oxidables por microorganismos aerobios (Ye et. al., 1992). Se ha informado también, la dechloración de BPCs en aguas de estuarios y sedimentos marinos vía la pérdida de cloro en las posiciones *meta* y *para* (VanDort y Bedard, 1991). Las investigaciones de laboratorio, indican que bajo condiciones anaerobias, el metabolismo de estos compuestos orgánicos depende básicamente de la disponibilidad de aceptores de electrones inorgánicos tales como el Cl^- y NO_2^- y en ocasiones, se requiere además de la adición de cosustratos como bencenos, bifenilos u otros compuestos orgánicos como fuente de energía (Evans, 1990).

Para la determinación de estas rutas metabólicas, se ha requerido del aislamiento de los microorganismos aerobios de varios tipos de ambientes por medio de las técnicas tradicionales de la microbiología, lo que ha permitido la investigación bioquímica y fisiológica de la biotransformación de los BPCs; sin embargo, el aislamiento de microorganismos anaerobios a partir de suelos y sedimentos no ha sido muy exitoso del todo por lo que los mecanismos bioquímicos de la dechloración reductiva no han sido dilucidados completamente (May et. al., 1992).

11.1. PRUEBAS DE BIODEGRADABILIDAD DE BPCs

Lunts y Evans (1970), fueron los primeros en postular las rutas de degradación aerobia utilizadas por los microorganismos para la oxidación del bifenilo, lo cual fue confirmado posteriormente por los estudios de Gibson et. al (1973); la oxidación se realiza hasta ácido fenilpirúvico con formación de compuestos intermedios como el 2,3-dihidroxibifenilo y el semialdehído α -hidroxi- β -fenilmucónico; Ahmed y Focht (1973), demostró la transformación del mono- y dicloro bifenilo a ácidos cloro benzóicos utilizando dos especies de *Achromobacter* y más tarde, se demostró la conversión de varios congéneres de BPCs a ácidos clorobenzóicos con otros cultivos puros (Furukawa y Matsumara, 1976; Ballsmiter et. al., 1977). Posteriormente, se dilucidaron las posiciones por las cuales se lleva a cabo la ruptura de los anillos mediante los estudios realizados en la especie *Achromobacter sp.* que utiliza *para*-cloro bifenilos como única fuente de carbono, el cual produce compuestos de rompimiento en *meta* para la ruptura del anillo, generándose además, ácidos benzóicos y *para*-clorobenzoico, con compuestos diol como intermedios (Catelani et. al., 1971).

El grupo de investigadores de Kaiser (1974) fueron los primeros en el aislamiento de cepas de bacterias del lago Ontario capaces de degradar el Aroclor® 1242 con generación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos como metabolitos sin evidencias de que en ellos existiesen moléculas de cloro.

Dentro de los trabajos iniciales sobre la biotransformación aerobia de los BPCs se encuentran los realizados por Ahmed y Focht, 1973 sobre dos especies de *Achromobacter* capaces de crecer en bifenilo y 4-clorobifenilo. De igual manera, se ha logrado la transformación total del 4-clorobifenilo en un proceso de dos pasos utilizando *Arthrobacter sp* M5 el cual lo transforma a 4 clorobenzoato que es posteriormente degradado por *Pseudomona aeruginosa* (Shield et. al., 1985).

Los estudios realizados por Tulp et. al. (1978), con mezclas de cultivos bacterianos aislados de lodos activados, demostraron tener buen crecimiento en 4,4'-diclorobifenilo como única fuente de carbono generando el ácido 4-clorobenzoico y el 4,4'-dicloro-2,3-dihidroxibifenilo como productos de degradación. Sin embargo, no se observaron metabolitos hidroxilados o ácidos carboxílicos cuando estos mismos cultivos bacterianos se hicieron crecer en los congéneres 2,4',5'-tri; 2,2',5,5'-tetra; 2,2',3,4,5'-penta; 2,2',3,4,5,5'-hexa y decaclorobifenilos como única fuente de carbono. En los trabajos de Furukawa y Matsumara (1976) utilizando una cepa de *Alcaligenes sp.* aislada de sedimentos, se comprobó que los congéneres 2-,3-, y 4-monoclorobifenilo; 2,3',- 2,4'-, 3,3'- 2,4-, 2,4-, 3,4-diclorobifenilos y 2,4,5-triclorobifenilo fueron degradados completamente en un período de 20 hrs. en contraste con los bifenilos tetra y penta clorados que fueron degradados muy lentamente. En la misma línea de trabajo, las investigaciones de Metclaf et. al. (1975), Baxter et. al. (1975) Clark et. al. (1979), Liu (1982), Hankin y Sawhney (1984) han demostrado también el incremento de biodegradación de los BPCs de bajo nivel de cloración.

Las excelentes investigaciones del equipo de Furukawa et. al. (1978), han descrito la interacción entre los BPCs y las bacterias; demostrando que las especies *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.* metabolizan gradualmente gran cantidad de triclorobifenilos marcados con C¹⁴; los productos metabólicos que contenían carbonos radiactivos como el ácido clorobenzóico fueron excretados al medio acuoso.

El grupo de investigación de Baxter et. al., (1975) ha demostrado que los mono- y dicloro bifenilos son degradados rápidamente por cepas de *Nocardia sp.* y *Pseudomonas sp.* con la adición de bifenilos al cultivo sin necesidad de períodos de adaptación de los microorganismos al BPC; en contraste con la biotransformación de los tri- y tetracloro bifenilos los cuales fueron degradados a una tasa mucho más lenta y para los cuales se requiere un período de adaptación. Los resultados de las investigaciones de Hamdy y Lin (1983), han reportado la máxima asimilación del 39,7 % observada en los cultivos de *Pseudomona aeruginosa* creciendo en un medio mineral de sales base durante un período de 90 a 130 días, la cepa fue capaz de degradar la mayor parte de los Aroclors® 1242 a concentraciones de 150 y 800 mg/L.

Cuando los microorganismos utilizan un compuesto como fuente de energía, también pueden utilizar otro co-sustrato como fuente complementaria. El co-metabolismo de los BPCs en presencia de acetato muestra un incremento de la transformación de los congéneres más altamente clorados debido probablemente al incremento del número de microorganismos con lo cual se llega a la completa degradación de los metabolitos intermedios generados de la degradación (Clark et. al., 1979). Se ha observado también que algunos clorobifenilos que no se degradan fácilmente cuando se encuentran solos en un medio de cultivo, lo hacen cuando se encuentran presentes en una mezcla o cuando se le agrega bifenilo al medio (Baxter et. al., 1975). El

incremento de la transformación se debe a que el bifenilo actúa como co-sustrato característico de varios procesos microbianos (Jacobson y Alexander, 1981).

La necesidad de un cosustrato implica que la mayor parte de la degradación se realiza mediante co-metabolismo o co-oxidación específico y en ocasiones es necesario añadir un análogo estructural por ejemplo un bifenilo para los BPCs o anilina para la 3,4-dicloroanilina con el fin de inducir las enzimas necesarias para la transformación incluso aún y cuando existen suficientes nutrientes y oxígeno en el medio (You y Bartha, 1982; Bruner et. al., 1985). Otro de los factores que influye en la biodegradación del BPC en el medio ambiente natural son las características del medio donde se lleva a cabo la degradación demostrado por los trabajos de Iwata et. al. (1973) sobre la transformación del Aroclor en varias muestras de suelos. Los estudios de Hankins y Sawhney (1984) demostraron el 70 % de transformación del Aroclor® 1248 en un período de 14 días en varias muestras de suelo, pero sólo 3 tipos de esos suelos demostraron tener capacidad para degradar el Aroclor® 1254; y solamente en un período de 112 días de incubación se detectó la degradación del 90% del Aroclor® 1248 y cerca del 48% del Aroclor® 1254, sin embargo, no se detectó transformación del Aroclor® 1260 en ninguna de las muestras de suelo.

Para establecer la potencialidad de biodegradación de los compuestos organoclorados como una propiedad estable de los reactores en un sistema de tratamiento biológico se requiere que el sistema debe ser más productivo que otros sistemas de tratamiento, debe tener rutas catabólicas completas que incluyan la asimilación de los compuestos catecol dentro de la misma población microbiana, deberá tener flexibilidad fisiológica, es decir, se debe garantizar la adaptabilidad del sistema al tipo de sustrato, las cepas de microorganismos para el biotratamiento deberá poseer facilidad de adaptación a compuestos organoclorados y finalmente se deberá garantizar la extrapolación de los estudios de laboratorio a los sistemas reales de tratamiento (Reineke, 1988).

11.2. MICROORGANISMOS CAPACES DE DEGRADAR BPCs

Gran número de estudios realizados en sedimentos han proporcionado evidencias de que los BPCs son degradados por diferentes tipos de microorganismos en condiciones aerobias y anaerobias en suelos, sedimentos, lagos y ríos (Wallnoffer et. al., 1973; Wong y Kaiser, 1975; Tucker et. al., 1975; Baxter et. al., 1975; Furukawa y Matsumara, 1976; Ballsmitter et. al., 1977; Sayler et. al., 1977; Carey, 1978; Clark, 1979; Liu, 1980).

11.2.1 BACTERIAS

Los primeros estudios de identificación de microorganismos capaces de degradar BPCs se realizaron por Evans, (1970); Catelani et. al. (1971) y Gibson et. al. (1973) en los cuales, se identificaron varias cepas bacterianas, principalmente Gram Negativas que utilizan el bifenilo como la única fuentes de carbono. En la misma línea de trabajo, Kholer (1988) ha demostrado que también ciertas cepas de bacterias Gram Positivas como *Arthrobacter simplex* BPA y *Arthrobacter sp.* BIB son capaces de degradar bifenilos.

Se han reportado también, gran variedad de cepas bacterianas nativas del suelo capaces de utilizar bifenilos y BPCs como única fuente de carbono. De igual manera, se han aislado de estuarios y ambientes marinos varios géneros de bacterias capaces de degradar BPCs y microorganismos resistentes a los BPCs, entre las que se encuentran los géneros: *Pseudomona*, *Vibrio*, *Aeromona*, *Microccu*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Sayler et. al., 1978). De igual manera, los estudios de Fritz y Su (1978) reportaron el aislamiento de 20 especies de bacterias degradadoras pertenecientes a los géneros: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*.

Es común encontrar bacterias adaptadas a la degradación de BPCs en sitios contaminados por derrames y estuarios varias especies entre las que destacan *Aeromonas sp.*, *Pseudomona sp.*, *Micrococcus sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Vibrio/Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, y *Streptomyces sp.* mientras que en ambientes marinos y sedimentos sólo se han podido aislar dos especies de bacterias degradadoras de BPCs correspondientes a los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio* (Sayler et. al., 1978).

Los microorganismos capaces de realizar la dechloración reductiva se encuentran en ambientes anaerobios como sedimentos de lagos y ríos (Tiedje et. al., 1994).

De los estudios de dechloración realizados bajo condiciones anaerobias se ha podido aislar un tipo de microorganismo que deshalogena reductivamente compuestos aromáticos clorados clasificado como anaerobio sulfato-reductor *Desulfonile tiedje* DCB1 que dechlora compuestos alifáticos clorados y halobenzoatos, y aunque no se ha demostrado su capacidad de dechlorar los BPCs, ha sido una cepa de gran utilidad en la investigación de los procesos de dechloración de los metabolitos generados a partir de la degradación de los benzoatos y clorobenzoatos (May et. al., 1992).

Ciertos microorganismos metanogénicos y sulfidogénicos de los sedimentos que utilizan cloro como aceptor electrónico terminal, involucran la adición de electrones al enlace C-Cl₂ seguido por la pérdida de cloro y abstracción del hidrógeno por lo que son capaces de dechlorar reductivamente diclorobenzoatos principalmente en las posiciones *meta* y *para* (Alder et al., 1993; Bedard, 1990; Erickson y Mondello, 1991; Havel y Reineke, 1991; Hayase et. al., 1990; Hernández et. al., 1990; Nawas y Chapatwala, 1991; Nies y Vogel, 1990).

Sylvestre (1980), ha descrito un método para el aislamiento de bacterias que degrada clorobifenilos de suelos y lodos activados; el método esta basado en rociar soluciones de BPC sobre una placa de agar previamente inoculada con la muestra ambiental en la cual, la película de BPC depositada sobre la superficie, realiza la selección de las colonias degradadoras de BPCs; las cepas obtenidas por este método tienen las características de ser aerobias estrictas, Gram negativas y capaces de utilizar 4-clorobifenil como única fuente de carbono.

Los experimentos realizados en suelos por Wong y Kaiser (1975) han demostrado la estimulación de crecimiento bacteriano utilizando los Aroclors® 1221, 1242, y 1254 como fuentes de carbono a concentraciones de 500 ppm. Sin embargo, en los estudios del crecimiento de *Escherichia coli* medidos durante 60 días por la evolución de CO₂; la degradación es inhibida a altas concentraciones del Aroclor® 1242 (Nissen, 1973) En los trabajos realizados por Bourquiny Cassidy (1975) sobre 85 especies de bacterias aisladas de estuarios 26 de ellas fueron inhibidas por la aplicación de 0,5 mg/ml de los Aroclor® 1016 y 1242 aplicados en un disco de

papel saturado con solvente; de estos, los géneros identificados como sensibles a los BPC incluyen *Favobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Serratia* de los cuales, gran porcentaje son Gram Positivas; la importancia de este trabajo radica en que las especies inhibidas son heterotróficas, y por el contrario, en los estudios de Sylvestre (1980), realizados con 19 colonias diferentes de bacterias aerobias se encontró que gran parte de ellas son Gram Negativas y tienen buen desarrollo en *para*-clorobifenilo o bifenilo como únicas fuentes de carbono.

Los estudios de Sayler et. al. (1977), Keil et. al. (1972) y Greer et. al. (1974) realizados con las especies *Achromobacter* y *Pseudomonas* aisladas de lagos demostraron que no fueron inhibidas con la aplicación de los Aroclors® 1221, 1242 y 1254 a concentraciones superiores a 0,1 %. Las especies *Serratia liquefaciens* y *Pseudomona aeruginosa* (Hamdy, 1983) tiene un buen desarrollo en presencia de 200 mg/ml de BPC además, son capaces de resistir concentraciones superiores de BPCs en buffer de fosfatos, lo que demuestra que pequeñas concentraciones de BPCs pueden estimular el crecimiento bacteriano, pero las altas concentraciones suelen ser tóxicas para la mayoría de los microorganismos.

La especie *Alcaligenes sp.* puede degradar gran variedad de congéneres de BPCs, incluyendo pentaclorobifenilos a través de una ruta oxidativa que incluye la producción de metabolitos clorados intermedios (Furukawa y Matsumara, 1976); de igual manera, los estudios de Clark et. al. (1979), han demostrado que los tetraclorobifenilos son degradados por mezclas de cultivos de *Alcaligenes odorans*, *Alcaligenes denitrificans* y una bacteria Gram Positiva no identificada.

11.2.2. HONGOS

En contraste con las bacterias, existe poca información referente a la biodegradación de BPCs por Hongos o levaduras. Los primeros estudios fueron realizados con *Aspergillus flavus* utilizando el Aroclor® 1242 y 1260. El equipo de investigación de Wallnofer et. al. (1973), ha reportado que la degradación del 4- y 4,4'-diclorobifenilo marcado con H³ utilizando *Rhizopus japonicus* sigue la ruta de degradación por la vía de formación de compuestos hidroxilados según lo demuestran los estudios de RMN realizados a los metabolitos generados. Se ha demostrado también que la degradación del Aroclor® 1242 por *Aspergillus niger* se ve inhibida por los cloros sustituidos en las posiciones *para* del congénere 4,4'-diclorobifenilo.

El hongo de la putrefacción blanca *Phanerochaete chrysosporium*, que secreta peróxido de hidrógeno y enzimas peroxidadas para degradar polímeros de lignina, ha demostrado ser capaz de mineralizar gran número de compuestos xenobióticos incluso de Aroclor® 1254. Lo que sugiere que un sistema lignocelulítico no específico puede servir para la eliminación de BPCs (Higson, 1992b).

En contraste con las bacterias, los hongos utilizan enzimas monooxigenasas que incorporan un átomo de oxígeno molecular dentro del anillo mientras convierten el otro en agua el compuesto intermedio resultante es un epóxido, el cual experimenta hidratación con agua para formar un compuesto *trans*-1,2-dihidro-1,2-dihidroxi intermedio y subsecuentemente un

compuesto dihidroxi. (Gibson, 1976). Este mecanismo es utilizado también en la degradación de anilinas, ácido benzoico y bifenilos (Smith y Rosazza, 1974). En algunos casos se puede adicionar más de un grupo hidroxilo, por ejemplo *Cunninghamella elegans* puede hidroxilar el bifenilo a 2-hidroxibifenilo, 3-hidroxibifenilo, 4-hidroxibifenilo, 2,4'-dihidroxi bifenilo y 4,4'-dihidroxibifelino incluso, puede adicionarse un tercer grupo hidroxilo lo cual facilita el metabolismo de la molécula (Dodge et. al., 1979). El mecanismo de ruptura en la posición *orto* es el más comúnmente utilizado por los hongos pero el ácido protocatecuic formado difiere del formado por las bacterias en que los ácidos 2-carboxi-*cis* y *cis*-mucónico son lactonizados a 3-lactona en los hongos y 4-lactona en las bacterias (Rochkind-Dubinsky et. al., 1986).

En algunos casos ciertos hongos como *Trichosporium cutaneum* que carece de enzimas dioxigenasas para degradar los ácidos protocatecuicos, gentísico y homoprotocatecuicos utiliza enzimas hidroxilasas NADH dependiente para metabolizar estos sustratos (Rochkind-Dubinsky et. al., 1986). El mecanismo de oxidación de los anillos da por resultado un compuesto intermedio llamado *cis*-1,2-dihidrodiol que se rompe por dos mecanismos: en posición *orto* por enzimas catecol 1,2-oxigenasas que abren el anillo entre los carbonos con grupos hidroxilos adyacentes metabolizando la molécula subsecuentemente por la vía de los ácidos *cis*-mucónico y cetoadipico hasta acetil-CoA y ácido succínico. La segunda ruta de rompimiento en *meta* abre el anillo en la posición adyacente a un grupo hidroxilo utilizando enzimas catecol 2,3-oxigenasas con compuestos ácido 3-hidroxi mucónico como intermedios, ácido pirúvico y un aldehído como productos finales (Rochkind-Dubinsky et. al., 1986). *Aspergillus niger* convierte el ácido benzoico a benzaldehído (Shoda, 1980).

Por otra parte, aunque la biotransformación de BPCs ha sido estudiada ampliamente, no existe suficiente información sobre la asimilación de los BPC por las plantas incluso, existen controversias de como los BPCs son trascolados en las plantas aunque se conocen bien los daños que pueden causarle. A este respecto, el equipo de Palt et. al. (1980), ha revisado la biotransformación de BPC en sistemas vegetales en suelos colectando microorganismos y productos de biotransformación de varias mezclas de bifenilos clorados y preparaciones comerciales de BPCs sin embargo, los resultados obtenidos no son del todo convincentes.

11.3. BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE BPCs

En los trabajos de investigación realizados hasta la fecha sobre los tratamientos aerobios aplicados a los BPCs, el rompimiento del anillo se considera una de las mejores rutas de transformación en el medio natural (Furukawa y Chakrabarty, 1982).

La principal ruta de biodegradación aerobia de los BPCs involucra la adición de oxígeno en las posiciones 2,3- y 3,4 por el ataque de enzimas dioxigenasas en el anillo no sustituido con producción de BPCs hidroxilados seguida por una deshidrogenación a catecol con ruptura del anillo (Figura XI- 1) y formación de compuestos clorados más sencillos como el ácido cloro benzoico como productos finales (Bedard, 1990; Furukawa, 1979; Nadim, 1988, Masse, 1985). Con base en los estudios del equipo de Furukawa Chakrabarty (1982), realizados con las cepas *Acinetobacter sp.* P6 y *Alcaligenes sp.* Y42 se establecieron las correlaciones entre la estructura

del BPC y su biodegradabilidad; denotándose que la biodegradación aerobia, esta generalmente limitada a los congéneres menos clorados con dos átomos de carbono adyacentes no substituidos y es generalmente menos efectiva conforme se incrementa el número de cloros en la molécula (Holmes, 1976) además de que la presencia de un anillo no substituido o menos clorado incrementa la degradación llegándose incluso a el rompimiento del anillo; y por el contrario, la factibilidad de la biotransformación decrece con el incremento del número de cloros en la molécula haciéndose notorio que los congéneres con cloros substituidos en la posición *orto* son los más resistentes a ser degradados, incluso existen reportes de que el congener 2,6,2',6'tetraclorobifenilo no ha sido degradado. De acuerdo con esto, el grupo de trabajo de Bedard 1987, demostró que estas observaciones son válidas también en los productos de degradación de la cepa *Corynebacterium sp* M1; en contraposición con esto, la cepa *Alcaligenes eutrophus* H850 ha demostrado degradar los isómeros di-*orto* substituidos (2,2' - ó 2,6,2',5'-); así como también, los isómeros 2,5-diclorobifenilo fueron degradados a cloro benzoato más rápidamente que los 2,3-diclorobifenilos; se ha demostrado también que la cepa de *Pseudomona sp.* LB400 puede degradar BPCs con carbonos adyacentes no substituidos como el 2,4,5,2',4'5'-hexaclorobifenilo (Bopp, 1986).

Se han demostrado varias rutas de degradación, principalmente en las posiciones *meta* y *para*, de la mayoría de los congéneres del Aroclor® 1242 y de sólo algunos congéneres del Aroclor® 1254. Sin embargo, en ninguno de ellos existen evidencias aparentes de la dechloración en posiciones *orto* (Koeman, 1993).

El Aroclor® 1260, es menos sensible a ser biodegradado debido a que posee congéneres tóxicos que la inhiben; hasta la fecha no existen evidencias convincentes de su transformación aerobia. Sin embargo, los tratamientos anaerobios han probado degradarlos efectivamente (Tiedje et. al., 1994).

Se han realizado varios trabajos de investigación sobre biodegradación de BPCs en reactores convencionales con sistemas de cultivos de microorganismos en suspensión utilizando gran variedad de bacterias y hongos aerobios y anaerobios tales como: *Escherichia coli* recombinante, *Achromobacter sp.* *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona putida*, *Pseudomona sp.* (grupo acidovorans) *Pseudomona paucimobilis*, *Pseudomona pseudoalcaligenes*, *Pseudomona testosteroni*, *Acinetobacter sp.* *Corynebacterium sp.* *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes sp.* *Alcaligenes fecalis*, *Arthrobacter sp.* *Penicillium chrysosporium* y *Aspergillus flavus* que degradan diferentes concentraciones de BPCs con rendimientos aceptables (Abramowicz, 1990).

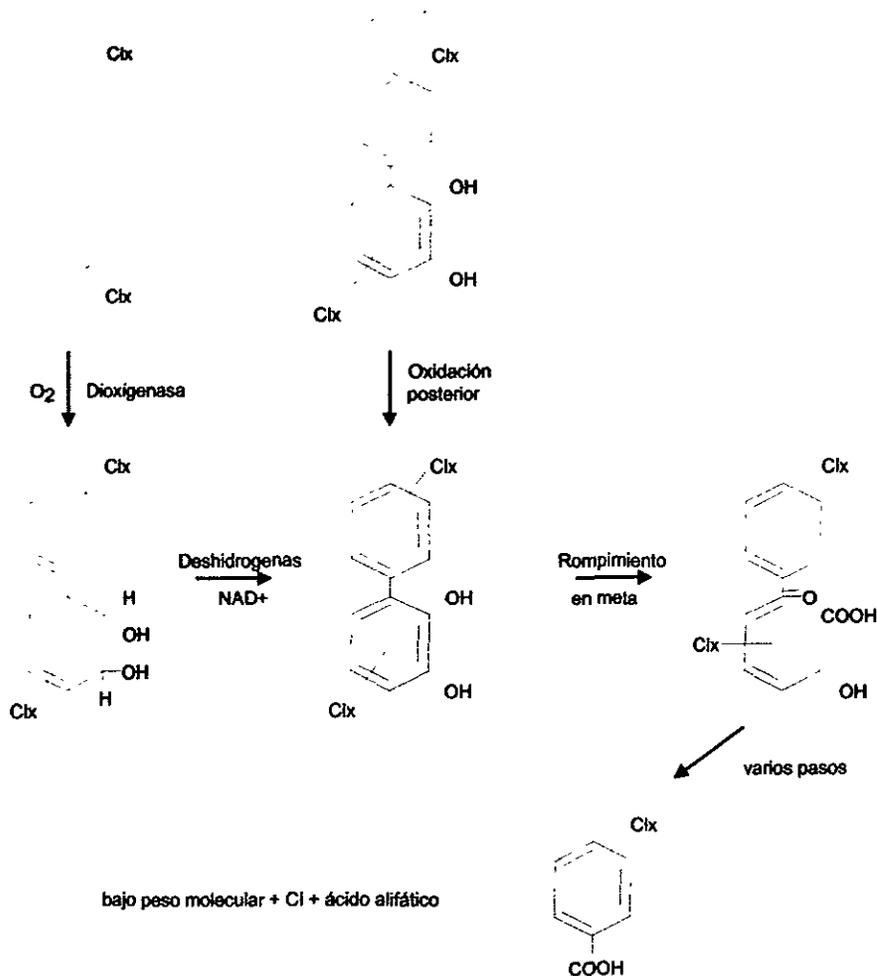


Fig. No.XII-1.- Mecanismo de biodegradación aerobia de bifenilos policlorados (Abramovicz, 1990).

Recientemente se ha utilizado el hongo de la putrefacción blanca, *Phanerochaete chrysosporium* que produce una enzima extracelular que degrada lignina en presencia de peróxido de hidrógeno. Esta enzima peroxidasa reacciona con el H_2O_2 para producir un radical oxo-Fe (IV)-Profirina altamente reactivo que elimina un electrón de anillo aril oxigenado formando un radical catión aromático (Evans, 1990).

11.3.1. FACTORES DE LA DEGRADACIÓN AEROBIA

Entre los principales factores que afectan la biodegradación de los BPCs en el ambiente, el número de átomos de cloro en la molécula es el factor más significativo, ya que el cloro altera las propiedades resonantes de los sustratos aromáticos y la densidad electrónica de los sitios específicos en donde se lleva a cabo la oxidación. Además, las posiciones ocupadas por los cloros tienen efectos de estereoquímica en la afinidad entre las enzimas de transformación y las moléculas de sustrato. También, otros factores tales como: su escasa solubilidad en agua, emulsificación, falta de nutrientes, y el tipo de matriz (tipo de suelo, sedimento y lodos).

El pH, temperatura, periodo de incubación, contenido de metales y sales, agitación del reactor, relación de densidad celular y concentración del BPC en el reactor son otros de los parámetros principales de control que se debe tener en cuenta para optimizar de la degradación de los BPCs hasta con 6 átomos de cloro por molécula (Sharma et. al., 1991).

En los procesos de biodegradación *in situ* de BPCs, los microorganismos requieren la adición de algún compuesto similar como nutriente para lograr una degradación rápida y completa de los BPCs; la adición de cosustratos estimula el crecimiento de la población y mejora su metabolismo facilitando el transporte por las membranas celulares y por lo tanto el ataque metabólico (Aggarwal et. al., 1991) proceso que ha sido comprobado por las investigaciones del equipo de Baxter et. al. (1975) con la adición de bifenilo al medio lo que incrementa el grado de biodegradación de los congéneres altamente clorados. Se ha demostrado también, que la tasa de biotransformación de los BPCs se incrementa haciendo crecer los microorganismos en emulsiones de lignina-BPC-sulfonato; el uso de esta emulsión, en el medio de crecimiento, permite a las células superar los factores de limitación de sustrato (Floodgate, 1979). Es recomendable también la adición de algún otro co-sustrato orgánico por ejemplo glucosa, acetato, metanol o acetona como donadores de electrones (Nies y Vogel, 1990).

11.3.2. PATRONES DE DEGRADACIÓN

El equipo de Furukawa et. al. (1978), ha estudiado el efecto de los patrones de sustituciones de cloro en la biodegradabilidad de la molécula de BPC utilizando 33 congéneres y cepas puras de *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.*, Tabla XI-1 ambas especies demostraron ser capaces de metabolizar gran parte de los congéneres de BPC.

Tabla No. XI-1.- Efecto de los patrones de sustitución de cloros en la biodegradabilidad de varios Congéneres de BPCs (Furukawa et. al. 1978)

Grupos de congéneres	Posición del cloro	Biodegradabilidad (%)	
		<i>Alcaligenes sp.</i>	<i>Acinetobacter sp. P6</i>
A	2-	>50	>50
	3-	>50	>50
	4-	>50	>50
B	2,3-	>50	46.4
	2,4-	>50	>50
	2,5-	>50	>50
	2,6-	0	4.1
	3,4-	>50	>50
	3,5-	>50	>50
C	2,2'-	6.3	14.0
	2,4'-	48.2	49.1
	3,3'-	—	18.5
	4,4'-	16.2	25.2
D	2,3,4-	35.1	32.0
	2,3,6-	0	0
	2,4,5-	46.0	32.4
	2,4,6-	3.1	46.0
E	2,5,2'-	1.6	5.1
	2,5,3'-	42.1	41.3
	2,5,4'-	21.8	30.4

	2,4,4'-	41.3	40.2
	3,4,2'-	15.6	38.6
F	2,3,4,5-	25.8	19.1
	2,3,5,6-	0	0
G	2,3,2',3'-	8.7	7.3
	2,4,2',4'-	0	0
	2,4,3',4'-	0	0
	2,5,2',5'-	0	3.5
	2,6,2',6'-	0	0
	3,4,3',4'-	0	0
H	2,4,5,2',5'-	0.6	0

a.- Suspensión en 10 ml de buffer de fosfato (pH 7,5) de una disolución de 500 ml de cada compuesto en etanol (10mM). La tasa de transformación fue calculada después de 1 h de incubación en los mono-, di y triclorobifenilos y de 2 h. para los tetra-, y pentaclorobifenilos.

b.- El número de células fue de 2×10^9 células/ml. en *Alcaligenes sp.* Y 42 y 4.4×10^8 células/ml. en *Acinetobacter sp.* P6.

De la tabla superior, sobre las interrelaciones entre la estructura química y biodegradación de los BPCs Furukawa et. al. (1978), realizaron las siguientes conclusiones:

- La tasa de degradación decrece marcadamente conforme se incrementan las sustituciones de cloro en la molécula.
- Los BPCs que contienen 2 átomos de cloros en las posiciones *orto* de un anillo (por ejemplo 2,6-) y en cada anillo (2,2'-) muestran una fuerte resistencia a la degradación como lo demuestran los estudios con los congéneres 2,6-, 2,2',-2,3,6- 2,5,2',- 2,3,5,6- y 2,6,2',6'-. Sin embargo el 2,4,6-triclorobifenilo es la excepción en esta serie de BPCs, ya que éste compuesto es rápidamente metabolizado por una ruta alternativa utilizando *Acinetobacter sp.* mientras que *Alcaligenes sp.* los metaboliza lentamente por la vía de conversión del ácido 2,4,6-triclorobenzóico.
- Los BPCs que contiene todos los átomos de cloro en un solo anillo son degradados más rápido que aquellos que contiene el mismo número de cloros pero en ambos anillos.
- Los BPCs que contienen dos átomos de cloro en las posiciones 2,3- de un anillo como los congéneres 2,3,2',3'-, 2,3,2',5'-, y el 2,4,5,2',3'- son mucho más susceptibles al ataque microbiano comparados con otros tetra- y pentaclorobifenilos. Además, los miembros de esta serie, se metabolizan a través de un patrón alternativo con acumulación de compuestos de difícil identificación.
- La ruptura del anillo en la molécula de bifenilo, ocurre en el anillo menos clorado de los dos.
- En el tratamiento aerobio, muchos de los componentes de los Aroclors® más altamente clorados son sólo hidroxilados sin llegar a ser mineralizados; sin embargo, ciertos congéneres altamente clorados no presentes en el Aroclor® 1260 pueden estimular la decloración.

11.3.3. BIODEGRADACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES DE BPCs Y SUBPRODUCTOS METABÓLICOS

Varios investigadores han reportado la degradación de mezclas comerciales de diferentes congéneres de BPCs con cepas puras y cultivos mixtos (Clark, 1979). El equipo de trabajo de Turker et. al. (1975), ha reportado la rápida biodegradación de mezclas de BPCs comerciales que

contienen predominantemente mono- y diclorobifenilos con microorganismos de lodos activados; sin embargo, conforme se incrementa el contenido de cloros en la molécula (tri-, tetra y pentaclorobifenilos) la tasa de transformación decrece proporcionalmente. La transformación a ácido clorobenzóico es la ruta más común de la degradación de BPCs en *Alcaligenes sp.* Y42 y *Acinetobacter sp.* P6 (Furukawa et. al., 1976y 1979); en congéneres que poseen múltiples cloros; se lleva a cabo la pérdida de cloros en el segundo anillo durante la formación de estos metabolitos tabla XI- 2.

Basados en las observaciones de la transformación de congéneres puros con *Acinetobacter sp.*, el equipo de Furukawa et. al. (1980), estudió mediante cromatografía de gases/masas con monitoreo total de iones selectivo los subproductos metabólicos de varias mezclas comerciales de Kaneclor®, (KC) 200, 300, 400 y 500 los cuales poseen di-, tri, tetra- y pentaclorobifenilos. Los resultados mostraron un rápido decremento del tamaño de los picos de los congéneres di- tri y tetraclorobifenilos y su reemplazamiento por los picos de los productos metabólicos; entre los cuales, el ácido monoclorobenzóico fue el predominante en la mezcla de reacción del KC 200 en cambio, en el KC 300 se observaron varios productos metabólicos tales como los ácidos mono y diclorobenzóico, además de compuestos di- y triclorodihidroxiados, compuestos de rompimiento en *meta* con dos y tres cloros, y productos no identificados formados a partir del 2,3,2',3'- o el 2,3,2',5'-tetraclorobifenilo o ambos. El KC 400 fue también susceptible a la biodegradación, en contraste con el KC 500 que fue difícilmente metabolizado a compuestos dihidroxiados.

Tabla XI-2.- Metabolismo de BPC por *Alcaligenes sp.* Y42 y *Acinetobacter sp.* P6 (Rochkind-Dubinsky, 1986; adaptado de. Furukawa et. al., 1976, 1978 y 1979).

2-clorobifenilo	2-clorobenzoato
3-clorobifenilo	3-clorobenzoato
4-clorobifenilo	4-clorobenzoato
2,3-diclorobifenilo	2,3-diclorobenzoato
2,4-diclorobifenilo	2,4-diclorobifenilo
2,5-diclorobifenilo	2,5-diclorobifenilo
2,6-diclorobifenilo ^a	2,6-diclorodihidroxi-bifenilo y 2,6-diclorotrihidroxi-bifenilo
3,4-diclorobifenilo	3,4-diclorobenzoato
3,5-diclorobifenilo	3,5-diclorobenzoato
2,3,5-triclorobifenilo	2,3,4,-triclorobenzoato
2,3,5-triclorobifenilo ^a	2,3,6-triclorodihidroxi-bifenilo 2,3,6-diclorotrihidroxi-bifenilo
2,4,5-triclorobifenilo	2,4,5-triclorobenzoato
2,4,6-triclorobifenilo	2,4,6-triclorobenzoato ^b 2,4,6-triclorodihidroxi-bifenilo ^a 2,4,6-triclorotrihidroxi-bifenilo ^a
2,3,4,5,-tetraclorobifenilo	2,3,4,5-tetraclorobenzoato
2,3,5,6-tetraclorobifenilo	No informado
2,3,4,5,6-pentaclorobifenilo	No informado
2,2'-diclorobifenilo	2-clorobenzoato
2,4'-diclorobifenilo	2-clorobenzoato
3,3'-diclorobifenilo	3-clorobenzoato
4,4'-diclorobifenilo	4-clorobenzoato
2,4,4'-triclorobifenilo	2-clorobenzoato y 2,4-diclorobenzoato
2,5,2'-triclorobifenilo	2-clorobenzoato y 2,5-diclorobenzoato
2,5,3'-triclorobifenilo	3-clorobenzoato y 2,5-diclorobenzoato

2,5,4'-triclorobifenilo	2-clorobenzoato y 2,5-diclorobenzoato
3,4,2'-triclorobifenilo	2-clorobenzoato
2,3,2',3'-tetraclorobifenilo	2,3-diclorobenzoato y un compuesto diclorado no identificado
2,3,2',5'-tetraclorobifenilo	Diclorobenzoato y un compuesto diclorado no identificado
2,4,2',4'-tetraclorobifenilo ^a	2,4-diclorobenzoato
2,4,2',5'-tetraclorobifenilo ^a	Diclorobenzoato
2,4,3',4'-tetraclorobifenilo ^a	Diclorobenzoato
2,5,2',5'-tetraclorobifenilo ^a	2,5,2',5'-tetraclorodihidroxi bifenilo
2,5,3',4'-tetraclorobifenilo ^a	Diclorobenzoato
2,6,2',6'-tetraclorobifenilo ^a	No informado
2,4,3',4'-tetraclorobifenilo ^a	3,4-diclorobenzoato
2,4,5,2',3'-pentaclorobifenilo ^a	2,4,5-triclorobenzoato y un compuesto triclorado no identificado
2,4,5,2',5'-pentaclorobifenilo ^a	2,4,5,2',3'-tetraclorodihidroxi benzoato

^a Metabolizado solo por *Acinetobacter* sp. P6

^b Metabolizado solo por *Alcaligenes* sp. Y42.

Se ha demostrado la presencia de metabolitos que contienen grupos nitro como el 2-hidroxi-4'-nitro-clorobifenilo y 4-hidroxi-4'-nitro-clorobifenilo cuando se hace crecer una bacteria anaerobia facultativa B 206 sobre 4-clorobifenilo al cual se le ha añadido nitrato de sodio al medio de cultivo como fuente de nitrógeno; este metabolito se interpreta como un resultado de una reacción no enzimática entre un óxido de arena intermedio y los aniones nitrito y nitrato (Sylvestre y Fauteux, 1982).

Alcaligenes sp BM2 es capaz de metabolizar mezclas de di-, y triclorobifenilos a concentraciones de 0.05 % en peso con un rendimiento del 80 % en un solo día y completamente metabolizarlo en 3 días. A concentraciones de 0.25 % en peso, sólo el 22 % fue metabolizado en un día y hasta 29 % en 3 días.

Bajo condiciones de co-metabolismo se ha demostrado la degradación de una mezcla de 100 mg/l de BPCs con di-, tri-, y tetra-cloro bifenilos (41% en peso) con un rendimiento del 70 % sólo en 2 días y del 80 % en 6 días. Utilizando un medio mineral mínimo, solo un 30 % fue metabolizado en 6 días (Yagi y Sudo, 1980).

Se ha informado también la mineralización de ciertos congéneres de Aroclor[®] utilizando *Nocardia* sp NCIB 10603 con un rendimiento de degradación del 60 al 100 % en un período de 3 semanas. En el mismo estudio, durante un periodo de 52 días el Aroclor[®] 1242 se metabolizó con un rendimiento del 88 % y en 100 días se llegó al 95%. En contraste el Aroclor 1216 se metabolizó con un rendimiento del 96 % en solo 52 días; el congénere 4-clorobifenilo de difícil degradación, se metaboliza solo en co-metabolismo con el Aroclor[®] 1242 en tan sólo un período de 2 días con un rendimiento del 50 % (Baxter, 1975). Este mismo compuesto se metabolizó con un rendimiento del 99 % en 30 días por una mezcla de cultivos obtenida de sedimentos (Kong y Sayler, 1983).

11.3.4. TRANSFORMACIÓN TOTAL DE BPCs CON PLÁSMIDOS

Los estudios de Horvath y Alexander (1970), han demostrado que en ambientes naturales, los consorcios de microorganismos llevan a cabo la degradación de BPC más completamente que

las cepas puras, y los clorobenzoatos así formados pueden ser metabolizados por otro tipo de bacterias tales como géneros de *Arthrobacter* (Ruisinger et. al., 1976), *Brevibacterium* (Hovarth y Alexander, 1971) *Alcaligenes*, (Knackmus y Reineke, 1973) y *Pseudomonas* (Dorn et. al., 1974; Hartman et. al., 1979). Por otra parte, la completa degradación y mineralización de los clorobenzoatos en diferentes ambientes naturales ha sido estudiada por diferentes investigadores; el equipo de trabajo de Dewey et. al. (1962) ha informado la completa biodegradación del ácido 2,3,6-triclorobenzóico en suelos; de igual manera GiGeronimo et. al. (1979), ha reportado que los organismos de los lodos activados son capaces de degradar los ácidos *orto*, *meta* y *para* clorobenzóicos así como también el ácido 3,4-diclorobenzóico de difícil degradación.

Gran variedad de investigaciones han demostrado que las modificaciones genéticas incrementan el rango y capacidad de degradación de los microorganismos. Sin embargo, las manipulaciones genéticas que pretenden mejorar las cepas de estos microorganismos es complicada por el hecho de que la mayoría de los residuos peligrosos no se degradan de forma completa con una sola reacción enzimática; y requieren varias rutas de varios pasos para lograr una mineralización completa y efectiva.

Una de las aplicaciones más importantes de las técnicas de biología molecular consiste en la transferencia de uno o más genes de un organismo a otro. Esta transferencia genética introduce nuevas capacidades metabólicas en el organismo huésped por medio de genes que codifican la transformación de moléculas complejas. Se han transferido también con éxito los genes para la transformación de los compuestos catecol de *Pseudomona sp* B13 a la cepa *Pseudomona putida* BN10 que degrada bifenilos logrando así una línea de degradación del bifenilo y compuestos catecol en un mismo microorganismo (Reineke y Knackmuss, 1979).

La conjugación, es otro de los métodos que consiste en trasladar la información genética deseada desde un organismo a otro. Se trata de un proceso natural mediante el cual se trasladan uno o más genes desde un organismo a otro, este sistema de transferencia genética es útil para introducir DNA nuevo en un huésped que ya contenga alguna de las propiedades deseables para degradar un rango de sustratos más amplio, o para que desarrolle nuevas actividades enzimáticas. El primer experimento realizado con este método, fue la introducción de rutas metabólicas híbridas utilizando el plásmido *TOL* introducido por conjugación en microorganismos que degradan compuestos aromáticos halogenados (Reineke y Knackmuss, 1979 y 1980). Los trabajos realizados con la cepa *Pseudomonas sp* B13 han demostrado que la ruta metabólica posee una enzima para degradar el 3-, y 4-clorobenzoato a través de la ruta catecol pero es necesario ampliar la especificidad de la primera enzima de la ruta metabólica para que pueda degradar los compuestos formados; esta barrera metabólica fue superada mediante la transferencia y conjugación del plásmido *TOL*, y la codificación de una enzima benzoato dioxigenasa en la cepa receptora.

Existen varias técnicas y procesos para realizar la transferencia genética; el uso de plasmidios denominados "*vectores de expresión*" es uno de ellos; este proceso se inicia con una secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción en uno o más lugares de clonación, por ejemplo la introducción de genes que codifican la ruta para la transformación de ciertos congéneres de BPCs en un plásmido de alto grado de replicación; los genes y las células que llevan éste vector, muestran una síntesis para la actividad degradadora de BPCs (Mondello,

1989); de igual manera, se han clonado los genes específicos para la producción de la enzima tolueno dioxigenasa de *Pseudomona putida* F1 introducida en *Escherichia coli* para la degradación de gran variedad de sustratos entre los que se incluyen tolueno, fenol, cresol, clorobenceno, diclorobenceno, xilenos, naftalenos, bifenilos y algunos diclorobifenilos (Zylstra y Gibson, 1989).

Los plasmidios también pueden enriquecer la especie bacterial con la habilidad de catalizar varios hidrocarburos y otros compuestos orgánicos. La conversión del 4-clorobifenilo a ácido 4-clorobenzóico por un plásmido "codificador" ha sido demostrada en *Klebsiella sp.* (Kamp, 1979). Los estudios de Furukawa et. al. (1982) han demostrado que el plásmido *pKFI* introducido en las especies *Acinetobacter sp* y *Arthrobacter sp.* especifica el catabolismo del bifenilo y clorobifenilo a benzoato y clorobenzoato.

En la misma línea de trabajo, los equipos de Hartman et. al. (1979) y Chatterjee et. al. (1982), han demostrado que la introducción de los plasmidios *TOL* y *pAC25* especifican la degradación del cloro benzoato y subcompuestos subsecuentemente en un quimiostato mediante el desarrollo de cadenas que pueden rápidamente utilizar los ácidos 4- y 3,5-diclorobenzóico. En estos procesos, la bacteria *Pseudomona putida* capaz de degradar el 4-clorobenzoato puede acoger el plásmido *pAC27* mientras que las cepas degradadoras del 3,5-clorobenzoato acogen el plásmido *pAC31* (Chatterjee et. al., 1982). Ambas cadenas tienen una porción del *TOL* en el cromosoma y ambos plásmidos especifican la codificación para el patrón correspondiente de la degradación de los compuestos 4- y 5-clorocatecol.

Un cultivo combinado de *Acinetobacter sp.* y *Arthrobacter sp.* que permiten más del 98% de utilización de mono o diclorobifenilo con liberación de cantidades equivalentes de iones cloro acogen el plásmido putativo *53 Mdal* especificado para la conversión de los clorobifenilos a ácido clorobenzóico. Existen también cepas de *Pseudomonas sp.* genéticamente construidas para utilizar mono o diclorobenzoatos que acogen plasmidios codificadores para la utilización completa de mono o dicloro benzoatos (Furukawa et. al, 1982).

El método de mutagénesis UV incrementa la transformación de los compuestos orgánicos clorados mediante la introducción continua de mutaciones inducidas por radiación. La mutagénesis y selección son utilizadas para ampliar la especificidad del sustrato de una enzima o de una ruta degradadora completa; a nivel laboratorio se ha desarrollado un dispositivo en una cámara de flujo continuo de radiación UV conectada a un biorreactor, que continuamente selecciona los microorganismos capaces de crecer a costa de los ácidos 4-clorobenzoico, 2,4-clorobenzoico y de otros compuestos orgánicos clorados (Levin y Gealt, 1997).

Los transposones son unidades de DNA de diversos tamaños y complejidad, que se autoinsertan en varios lugares del genoma bacteriano combinando funciones que son codificadas por los propios transposones. Una ruta metabólica que emplea transposones es la ruta catabólica del clorobenzoato que utiliza el transposon *Tn5271* el cual permite el crecimiento del organismo huésped sobre el 3- y 4-clorobenzoato (Nakatzu et. al., 1991); Además, se pueden introducir en diferentes bacterias huéspedes durante la adaptación a la presencia de 4-cloro anilina. (Fulthorpe y Wyndham, 1992). Estos transposones se han utilizado para introducir nuevas funciones genéticas que amplían la especificidad de las vías metabólicas por ejemplo, los genes de la cepa de *Pseudomona sp.* P51 que contienen la enzima cloro benceno dioxigenasa son utilizados como

un elemento transposable, *Tn5280* con el fin de ampliar el rango degradador de varios organismos receptores (DanRur et. al., 1991).

Otra estrategia, es la combinación de genes de rutas separadas de degradación para producir rutas híbridas de degradación que se pueden aplicar al uso de genes clonados específicamente diseñados para un catabolismo específico; esta aplicación, tiene algunas ventajas sobre las cruas convencionales de construcción de cadenas con nuevas propiedades catabólicas, por ejemplo los clones de fragmentos de DNA que poseen características específicas para la transformación de un determinado compuesto o bien, el uso de fragmentos de DNA que contiene los genes esenciales para evitar la mutación por acción del compuesto (Reineke et. al., 1988). La combinación de cadenas capaces de degradar BPCs y clorobenzoatos que permiten la total transformación de mono y diclorobifenilos es un ejemplo del rol que juegan varios plásmidos en la mineralización total de algunos compuestos clorados.

Los estudios realizados por Khan (1988 y 1989) en la clonación de *Escherichia coli* con genes codificadores de *Pseudomona putida* OU83 para la metabolización del 4-cloro bifenilo a 4-clorobenzoato fue necesario utilizar la enzima endonucleasa *Hind III* en combinación del vector *pC13*; los fragmentos se ligaron dentro del sitio *Hind III* de *Escherichia coli*. En la misma línea de trabajo, Mondello (1989), realizó la clonación de genes *bphABCD* de *Pseudomona sp.* LB400 con mapeo de restricciones para los genes *bph* los cuales son diferentes de los genes *KF715* de *Pseudomona putida*. El genoma LB400 se construyó a partir del plasmidio *pMMB34* y *Escherichia coli*. El plásmido así formado, posee el gen codificador para la conversión de BPCs a clorobenzoato y recibe el nombre de *pGEM410*.

Se ha logrado también la clonación de los genes de la cadena *Pseudomona testosteroni* B356 especificada para la transformación del 4-clorobifenilo a 4-clorobenzoato dentro de *Pseudomona putida* KT2440 utilizando el plásmido *pSA842*.

Las investigaciones anteriores son un excelente ejemplo del uso de la conjugación y selección para mejorar las propiedades de un microorganismo activo frente al tratamiento de los BPCs; aunque se han obtenido buenos resultados en laboratorio, los estudios a escala real todavía están en fase de desarrollo (Giamporcaro, 1997). Por otra parte, el uso de los microorganismos manipulados por ingeniería genética presenta una gran oposición y presión por parte de los sectores críticos profesionales preocupados por que estos productos puedan ejercer un impacto adverso sobre el ambiente. La presión es tan fuerte que hasta la fecha, no se ha realizado ningún ensayo real para degradar residuos peligrosos con microorganismos manipulados en campo (Levin y Gealt, 1997).

11.4. DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS RELACIONADOS CON LA BIODEGRADACIÓN DE BPCs

En todo proceso de investigación es importante conocer la degradación de los subcompuestos formados en tratamiento biológico de cualquier compuesto para establecer las rutas y concretar las líneas metabólicas a desarrollar en los reactores biológicos a efecto de evitar los posibles efectos de toxicidad por metabolitos generados y establecer un segundo tratamiento

secuencial. La biodegradación de los bifenilos policlorados está relacionada con gran cantidad de compuestos entre los que destacan:

11.4.1. BIFENILOS

Gibson et. al., (1973) y Lunt y Evans (1970), han demostrado que *Beijerinckia sp* degrada los bifenilos iniciando con la hidroxilación de los carbonos 2 y 3 de uno de los anillos y rompimiento de la posición *meta* de dos maneras: por el rompimiento del anillo entre los carbonos 3 y 4 para rendir un compuesto semialdehído 2-hidroxi-3-fenilmucónico y subsecuentemente un ácido fenil pirúvico. Y por el rompimiento del 2,3-hidroxibifenilo entre los carbonos 1 y 2 para formar el ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoico y posteriormente el ácido benzóico (Catelani et. al., 1973 y 1974). El rompimiento de la posición *meta* del anillo dihidroxilado se lleva a cabo en entre el carbón angular y el grupo hidroxilo adyacente.

11.4.2. BENCENO

Además de los estudios de mineralización parcial de los anillos de benceno bajo condiciones fermentativas-metanogénicas (Vogel y Grbic-Galic, 1986; Grbic-Galic y Vogel, 1987), los estudios de Colberg y Young (1995) han demostrado su biotransformación bajo condiciones anóxicas.

11.4.3. BENZOATO

Taylor, 1970, fue el primero en describir la cepa *Alcaligenes xylosoxidans* PN1 como capaz de degradar benzoatos utilizando nitratos (NO_3^-) como aceptores de electrones. De igual manera, los estudios de Williams y Evans (1973 y 1975) han demostrado que *Moxerella sp* mineraliza benzoato durante la reducción de nitratos mediante la descarboxilación a catecol y subsecuente metabolización por la ruta *orto*.

11.4.4. ACIDO CLOROBENZÓICO

Los ácidos clorobenzóicos se introducen en el medio ambiente como un producto de la degradación de los bifenilos policlorados (Ahmed y Focht, 1973). Los ácidos clorobenzóicos pueden ser metabolizados por las bacterias a varios productos intermedios; el mecanismo más común es su conversión a clorocatecol que mediante la ruptura en la posición *meta* se transforma a compuestos semialdehídos y cloromucónicos de difícil metabolización; por ejemplo, la ruta de rompimiento en *meta* del 3-clorocatecol inactiva la acción de la enzima *meta*-protocatecasa causando la acumulación de compuestos clorocatecol que no puede ser mineralizado y cuyo incremento de concentración llega a ser tóxica para las bacterias. Por el contrario, la ruta de rompimiento *orto* por la enzima *orto*-protocatecasa da por resultado la formación de un ácido mucónico clorado que es cicloisomerizado con la subsecuente eliminación de ion cloruro (Cl^-) y

finalmente mineralizado. Para lograr esto, se han realizado estudios de hibridación de cepas de *Pseudomona B13*, *P. putida* con el plásmido *TOL* capaz de mineralizar un amplio rango de ácidos clorobenzóicos. Existe además, la ruta de hidroxilación común de los compuestos aromáticos para formar compuestos catecol (Rchkind-Dubinsky et. al., 1986).

Se ha reportado también, otra ruta en *Pseudomona sp* y *Arthrobacter sp* por la cual, el ion cloruro se reemplaza por un grupo hidroxilo directamente dando por resultado un ácido hidroxibenzóico no clorado que puede ser fácilmente metabolizado (Risinger et. al., 1976).

Estudios realizados con hongos específicamente *Aspergillus niger* creciendo en ácido 2-cloro y 3-clorobenzóico han demostrado su fácil metabolización (Shailubhai et. al., 1984).

En los proceso anaerobios, la dechloración reductiva es la ruta principal que convierte el ácido 3-clorobenzoico a ácido benzóico como compuesto intermedio y finalmente a metano y CO₂ (Sufliita et. al., 1982). De igual manera, las consorcios anaerobios actúan sobre 4-clorobifenilo, ácido 2,5-dinitrobenzóico y 4-cloroanilina (Jacobson et. al., 1981).

11.4.5. CLOROBENCENOS

Los clorobencenos se utilizan como diluyentes de BPCs en transformadores y capacitores eléctricos, por lo cual es muy común encontrarlos en conjunto y difícilmente separarles de ellos (Marinucci y Bartha, 1979). La mayoría de la información que existe sobre del metabolismo de los clorobencenos provienen de estudios realizados en suelos y consorcios de microorganismos información existente sobre rutas metabólicas con cultivos puros es muy escasa; sin embargo, los clorobencenos que contienen menos de 5 cloros se pueden mineralizar por poblaciones de *Pseudomona putida* previamente aclimatada con formación de compuestos clorocatecol (Gibson et. al., 1968) o clorofenoles (Ballschmitter et. al., 1977) como productos principales de su degradación, los cuales se pueden metabolizar fácilmente por la ruta de ruptura en *orto* (Reineke et. al., 1984).

Los cloro bencenos menos clorados son difíciles de determinar en los biorreactores debido a su pérdida por volatilización (Wakeham et. al., 1983).

La degradación aerobia de los clorobencenos ha sido demostrada por diferentes investigadores con diferentes procesos pero está limitada por el número de cloros en el anillo siendo los tetra-, penta-, y hexaclorados los más fácilmente degradados por la vía clorocatecol (Haggblom, 1992). Sin embargo, Bouwer y McCarty (1985) ha demostrado la degradación de los tri-, di-, y monoclorobencenos utilizando biopelículas aerobias desarrolladas en acetato después de un periodo de aclimatación previa de la biomasa al contaminante.

La dechloración reductiva de los di-, y triclorobencenos a monocloro benceno ha sido demostrada en reactores de columna conteniendo sedimentos anaerobios del Río Rhin utilizando ácidos alifáticos, glucosa o alcohol como donadores de electrones para la población metanogénica (Kuhn, 1985; Bosma et. al., 1988; VanDer Meer et. al., 1992).

Fathepure y Vogel (1991) han demostrado la deshalogenación de hexaclorobenceno a di- triclorobenceno seguida de la mineralización aerobia a CO₂ y productos no volátiles en un

proceso secuencial anaerobio-aerobio con la adición de glucosa, metanol y acetato como fuente primaria de carbono.

11.4.6. CLORONITROBENCENOS.

La degradación del cloronitrobenceno por hongos se ha estudiado ampliamente en la detoxificación de los fungicidas (Corbett, 1981).

El metabolismo del 4-cloronitrobenceno involucra una reducción secuencial para formar 4-cloronitrosobenceno y subsecuentemente 4-clorofenilhidroxilamina que se puede metabolizar por dos mecanismos; la ruta principal, es la reducción posterior a 4-cloroanilina seguida por acetilación para producir un compuesto 4-cloroacetanilida como el mayor metabolito acumulado en el medio de cultivo. El mecanismo alternativo, involucra el cambio de el grupo hidroxilo por el de nitrógeno al carbono (llamado rearrreglo Bamberger) dando por resultado compuestos 4-hidroxi anilina y 2-amino-5-clorofenol. La 4-hidroxianilina involucra la pérdida de un ion cloruro y la subsecuente acetilación dando por resultado también la formación de 4-hidroxiacetanilida. De igual manera el pentacloro nitro benceno se metaboliza a pentacloroanilina por *Streptomyces aureofaciens*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y muchos otros géneros de actinomicetes (Chacko y Loochwood, 1966; Nakanishi y Oku, 1969). Y *Rhodosporidium sp* creciendo en 4-cloronitrobenceno produce varios metabolitos (Corbett, 1981).

11.4.7. ANILINAS

*Rhodococcus sp.*AN-177 utiliza anilina como única fuente de carbono y energía metabolizandola exclusivamente a catecol por la ruta *orto* (Kaminski et. al. 1983). En contraste con *Pseudomonas* SB3 que utiliza dos rutas enzimáticas; una con una enzima pirocatecasa de rompimiento en *meta* y la otra con una enzima deshidrogenasa que actúa sobre los compuestos semialdehido hidroximucónicos. De igual manera, *Nocardia sp.* y *Pseudomonas sp.* convierten las anilinas a catecol por un sistema de enzimas dioxigenasas (Walker, 1969). Eadsford (1985), ha informado sobre varios compuestos xenobióticos aminados son metabolizados por enzimas aminohidrolasas, L-amino-ácido-oxidasas y transaminasas involucradas en la ruptura hidrolítica de un oxiareno por una hidrolasa epoxida seguida por una oxidación rindiendo compuestos -butoxy- y oxoácidos.

11.4.8. CLOROANILINAS

Las anilinas mono sustituidas particularmente las 3- y 4-cloroanilinas se utilizan como única fuente de carbono por algunos microorganismos como *P. putida*, *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus sp.* y *Paracoccus sp.* (Bollag y Russel, 1976; Janke et. al., 1984; Surovtseva et. al., 1981; You y Bartha, 1982; Zeyer y Kearney, 1982). La ruta metabólica involucra el rompimiento en la posición *orto* convirtiendo así la 3,4-cloroanilina a 4,5-diclorocatecol y finalmente a ácido succínico por la ruta de rompimiento en posición *meta*

análoga al proceso de degradación de las anilinas. Sin embargo, la dicloroanilina se puede metabolizar por un mecanismo diferente con formación de compuestos dicloroformilánilina (Kearney y Plimmer, 1972; You y Bartha, 1982). Existe también un estudio que sugiere que el grupo amina es removido sin oxidación de los anillos (Zeyer y Kearney, 1982; Rochkind-Dubinsky et. al., 1986).

El metabolismo de la 4-cloroanilina por hongos como *Fusarium oxysporum* sigue varias rutas; la principal de ellas es la N-hidroxilación; las moléculas así hidroxiladas como la 4-cloroanilina son relativamente inestables y fácilmente convertidas a 4-clorofenoxi-hidroxilamina, la que posteriormente se convierte a 4-cloronitrosobenceno y 4-cloronitro benceno y en algunos de los pasos el ion cloro se elimina durante la reacción (Kaufman et. al., 1973).

Arjmand y Sandermann (1985 y 1986) demostraron la habilidad de *P. chrysosporium* para mineralizar gran variedad de compuestos aminoaromáticos como cloroanilinas, anilinas y 2,4,6-trinitrotolueno.

11.5. TRATAMIENTOS ANAEROBIOS

Debido a su hidrofobicidad, los BPCs tienden a transferirse y a acumularse en ambientes anaerobios donde los procesos de deshalogenación reductiva, por ejemplo rompimiento reductivo del enlace carbón-halógeno puede ser un importante proceso de biotransformación (Alder et. al., 1993), aunque el grado de biodegradabilidad de la molécula está en función de la estructura aromática y la posición del halógeno.

La degradación bajo condiciones anaerobias se lleva a cabo bajo dos patrones: la dechloración reductiva vía *orto* > *meta* > *para* con reactividad de los congéneres dependiendo del potencial de reducción y la dechloración vía *meta* > *para* las cuales molecularmente son las más importantes (Brown et. al., 1987).

Los BPCs más tóxicos, son los congéneres con características similares a las dioxinas que se encuentran sustituidos en las posiciones *meta* y *para* de cada anillo y con no más de una posición *orto* por ejemplo los congéneres 3,3',4,4'-, 2,3,3',4,4'- o 2,3',4,4'5'- clorobifenilo; la degradación anaerobia de los cloros en *meta* y *para* elimina su toxicidad (Quesen et. al., 1988).

El estudio de la degradación anaerobia de los BPCs, surgió mediante el análisis de la biodegradación natural que ocurre en sedimentos de los ríos; este tipo de biotransformación realiza la dechloración de los BPCs reduciendo el contenido de los átomos de cloro en la molécula principalmente en las posiciones *meta* y *para* del anillo bifenílico dejando intacto el anillo y con menos cloro, incluso en ciertas ocasiones llega a romperlo (Boyle, 1992). Los resultados obtenidos de las investigaciones en laboratorio, han permitido determinar los patrones de dechloración anaerobia de los diferentes congéneres de BPCs; sin embargo, estas predicciones en ambientes naturales no son tan fáciles ya que las diferentes condiciones ambientales, así como las características fisicoquímicas y microbiológicas del sitio interfieren grandemente (Evans, 1990).

La mayoría de los BPCs coplanares que se encuentran en las mezclas comerciales son estructuralmente similares a las 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxinas y poseen una toxicidad

similar que depende del número de cloros en las posiciones *meta* y *para* del anillo. En los Aroclors[®], los átomos cloro son removidos preferencialmente del anillo en las posiciones *meta* y *para* mientras se preservan las posiciones *orto* (Quesen et. al., 1988). Si bien, la remoción de los átomos de cloro en las posiciones *meta* y *para* (Quesen et. al., 1988; Nies et. al., 1990) aunque no reducen la concentración molar de los BPCs, pueden reducir su toxicidad para los mamíferos, además de hacerlos más fácilmente biodegradables por microorganismos aerobios (Fava et. al., 1993). Los estudios de VanDort y Bedard (1991) han demostrado que puede llevarse a cabo la dechloración en la posición *orto* si la comunidad bacteriana se induce primero por la adición de congéneres *meta* enriquecidos. Por otra parte, los congéneres *orto* sustituidos existen solo en muy poca cantidad en las mezclas de Aroclor[®] por lo que se ven reducidos los riesgos de toxicidad para los microorganismos (Tiedje et. al., 1994).

Los estudios de Tiedje et. al. (1994) han dilucidado la existencia de tres patrones de dechloración anaerobia: a) sólo posiciones *meta*, b) sólo posiciones *para*, c) ambas posiciones *meta* y *para* y d) aunque no es muy frecuente, se ha informado también, la transformación de al menos una posición *orto* como sucede en el 2,3,5,6-tetraclorobifenilo (Van Dort y Bedard, 1991).

Los estudios realizados por Quesen et. al. (1988 y 1990) y Nies y Vogel (1990) sobre la transformación anaerobia en sedimentos del Río Hudson y de Silver Lake contaminado con los Aroclors[®] 1242 y 1260 a concentraciones de 700 ppm demostraron la dechloración reductiva de los congéneres altamente clorados principalmente en las posiciones *meta* y *para* y la correspondiente acumulación de los congéneres menos clorados principalmente de sustitución en la posición *orto* removiéndose el 53 % del total de cloro de la molécula en un período de 16 semanas; resultados similares fueron obtenidos en los trabajos de Ye et. al. (1992), y Rhee et. al. (1989) con la única diferencia de la falta de acumulación de congéneres monoclorados observada por Quesen et. al. (1989) además de que los cultivos utilizados demostraron tener una preferencia por la dechloración en las posiciones *meta* (Ye et. al., 1992).

Los patrones de transformación de los congéneres indican que las poblaciones nativas de los sedimentos de río Hudson contaminados con BPCs son capaces de atacar un amplio espectro de congéneres, incluyendo los pentaclorados en un período de 7 meses. Una característica de la transformación es la ausencia de cloros adyacentes en ambos anillos del bifenilo (Rhee et. al., 1989).

En los estudios de Van Dort y Bedard (1991), sobre las rutas de transformación, la mayor ruta de dechloración fue del 2,3,5,6-clorobifenilo (CB) a \rightarrow 2,3,6-CB a \rightarrow 2,6-CB. (*Patrón 1* de la Figura XI-2); pero existen otras rutas posibles de formación del 2,5-CB; por ejemplo, la pérdida simultánea de ambos cloros es teóricamente posible, pero no existen precedentes biológicos para este tipo de dechloración; es más común que los cloros se eliminen secuencialmente por cualquier o ambas rutas posibles del 2,3,5,6-CB a \rightarrow 2,3,5-CB a \rightarrow 2,5-CB (*patrón 2*) o por la ruta del 2,3,5,6-CB a \rightarrow 2,3,6-CB (idéntica a la ruta del 2,5,6,-CB) a \rightarrow 2,5-CB (*patrón 1a*). Sin embargo, el *patrón 1* es al parecer, el más viable. Estos patrones podrían explicar la existencia de varias poblaciones de microorganismos que dechloran BPCs secuencialmente en los sedimentos.

Es importante hacer notar que la única dechloración en la posición *orto* es la del isómero 2,3,5,6-CB. Sin embargo, la presencia de uno o más átomos de cloro en la posición *orto* fue la

principal causa de la disminución de la transformación de los congéneres hepta y hexaclorados y de los congéneres recalcitrantes 2-clorobifenilo en los estudios realizados por Fava et. al. (1993).

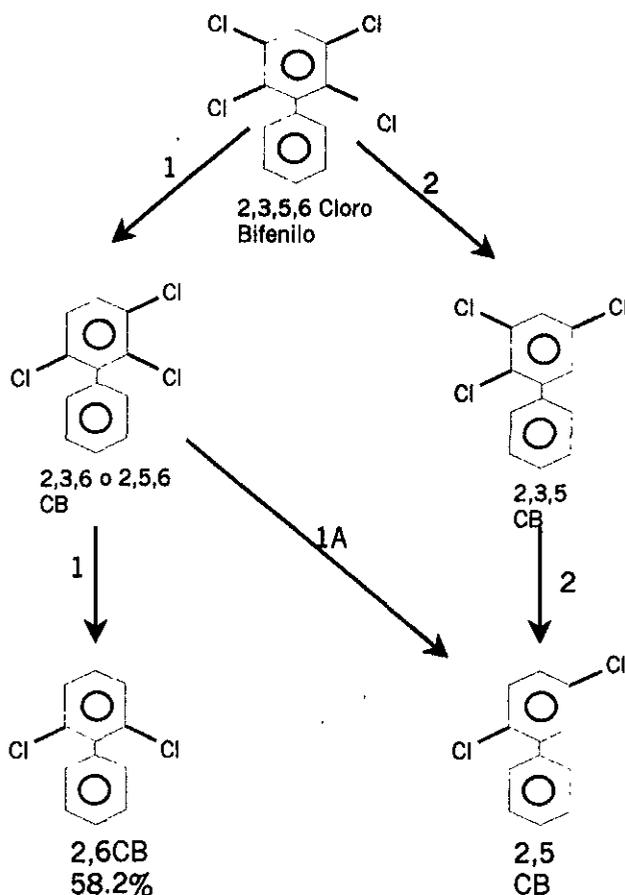


Fig. No. XI-2.- Rutas de dechloración propuestas para el 2,3,5,6-clorobifenilo (-CB) mostrando la distribución molar y los productos de la dechloración (VanDort y Bedard, 1991).

11.5.1. RUTAS DE DECLORACIÓN

Se acepta ampliamente que los Aroclors® son dechlorados por la pérdida de los cloros en las posiciones *meta* y *para*, pero esto es una simplificación muy ligera ya que existen múltiples factores que gobiernan con exactitud la posición que será dechlorada.

Los patrones de dechloración se pueden describir como la serie de reacciones que indican cuáles congéneres se utilizan como sustratos, qué cloros pueden ser removidos de esos congéneres y el orden en el cual se remueven por ejemplo: las reacciones que definen un tipo específico de dechloración *meta* se refieren como un proceso o actividad M, y el congénere de BPC resultante pertenece al patrón M; en algunos casos, los patrones de dechloración reflejan la actividad combinada de dos o más procesos distintos de dechloración (Bedard y Quesen, 1995). Existen aparentemente seis distintos procesos de dechloración microbiana que pueden ocurrir

separadamente o en combinación, los cuales se pueden identificar por medio del análisis de los congéneres progenitores y los correspondientes productos generados (Bedard y Quesen; 1995).

El indicador más sensitivo de la dechloración es la presencia de productos de dechloración típicos de BPCs en proporciones no encontradas en los estándares de los Aroclors® comerciales que pueden diferir dependiendo de los tipos de congéneres presentes y de la especificidad de la dechloración, por ejemplo los congéneres 2-CB (2-CloroBifenilo); 2,2'-CB; 2,3-CB; 2,4-CB; 2,4-3CB; 2,5-3CB; 2,6,2'-CB; 2,6,3-CB; 2,6,4-CB; 2,4,2',4'-CB; 2,4,2',5-CB; 2,4,2',6-CB; 2,5,2',5'-CB y 2,5,2',6-CB. Un segundo indicador de dechloración es el decremento selectivo de los congéneres que comparten la misma configuración de cloros en un anillo o que comparten una misma forma común, como por ejemplo una molécula de cloro en posición *para* en el mismo lado.

De los principales estudios de dechloración realizados en laboratorio, los trabajos de Quesen et. al. (1988 y 1989) demostraron la dechloración reductiva de la mayoría de los congéneres de los Aroclor® 1242, 1248, 1254 y 1260 con microorganismos anaerobios obtenidos de los sedimentos de los Ríos Hudson y Silver Lake; los microorganismos del Río Hudson removieron todos los cloros de las posiciones *meta* y *para* de los Aroclors® 1242, 1248 y 1254, proceso de dechloración conocido como proceso C (Brown et. al. 1984 y 1987). En contraste con esto, la dechloración del Aroclor® 1260 por los mismos microorganismos fue realizada por el otro proceso mucho más selectiva (proceso H) (Quesen et. al., 1990; Brown et. al., 1990).

La dechloración de los Aroclors® 1242 y 1260 con microorganismos de los sedimentos de Silver Lake rindieron una distribución de congéneres diferente a los realizados por los del Río Hudson (Quesen et. al., 1990) por lo que Brown (1990) propuso que existen diferentes microorganismos con características específicas para dechlorar BPCs en sedimentos contaminados confirmado en las dos diferentes localidades. Al mismo tiempo, muchas otras investigaciones de laboratorio reportaron la deshalogenación de BPCs y bifenilos polibromados con diferentes microorganismos de sedimentos anaerobios (Nies y Vogel, 1990; VanDort y Bedard, 1991; May et. al., 1992; Morris et. al., 1992 a, b, y 1993; Ye y Quesen, 1992; Alder 1993; Abramowicz et. al., 1993; Bedard, 1993; Boyle, 1992; Fava et al, 1993; Rhee et. al., 1993^{a,b,c}; Williams y Evans, 1994).

Los experimentos se realizaron con la adición de congéneres de BPCs a los sedimentos anaerobios con el objeto de determinar las rutas por las cuales los congéneres se dechloran, el efecto de la sustitución de los cloros en los patrones de reactividad, las capacidades de dechloración de la población microbial y los productos terminales de la dechloración de BPCs.

El equipo de investigadores de Brown et. al. (1984) presentaron evidencias de la dechloración de BPCs en sedimentos acuáticos de varias otras localidades como Silver Lake, Sheboygan River, Waukegan Harbor, Acushenet Estuary y Hoosic River. Se propuso también que los diferentes patrones de dechloración son resultado de la acción de diferentes enzimas con diferente selectividad por distintos congéneres similares a las enzimas responsables de la dechloración de los clorobenzoatos y clorofenoles (Suflika et. al., 1982; Boyd et. al. 1983). Brown et. al. (1987) propuso que las bacterias anaerobias que poseen tales enzimas pueden utilizar BPCs como aceptores de electrones y utilizando la energía de la dechloración. Finalmente, Brown et. al. (1987) puntualizó que los congéneres remanentes de la dechloración parcial de las mezclas

de Aroclor® en los sedimentos acuáticos se agotaron especialmente aquellos relacionados con la inducción de los citocromos P₄₄₈ o de alta toxicidad *para* los mamíferos.

El metabolismo de los anillos aromáticos en ausencia de oxígeno molecular puede realizarse también por otras formas: a) a través del fotometabolismo anaerobio; b) bajo condiciones reductoras de nitrato en cultivos mixtos y por cepas puras de *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, y *Moraxella sp.*, c) con sulfato como aceptor de electrones, d) en consorcios a través de fermentación con metanogénesis y e) a través de fermentación (Sleat, 1984).

Existe poca información acerca de los microorganismos responsables de la deshalogenación del grupo arilo pero las investigaciones de Mohn y Tiedje (1992), han podido aislar y estudiar en detalle un microorganismo llamado *Desulfonile tiedje* que deshalogena benzoatos pero no BPCs. Sin embargo, las características fundamentales que exhibe *D. tiedje* en la deshalogenación del grupo arilo, pueden ser válidas para otras cepas deshalogenadoras. Entre ellas se encuentran: 1) la deshalogenación reductiva del grupo arilo está catalizada por enzimas inducibles, 2) estas enzimas exhiben distinta especificidad de sustrato, 3) la función deshalogenadora del grupo arilo es una característica de comunidades sintróficas y es dependiente de ellas, 4) las bacterias deshalogenadoras del grupo arilo obtienen energía del metabolismo de la dechloración reductiva (Mohn y Tiedje, 1992)

La especificidad de la dechloración microbiana varía ampliamente aún dentro del mismo sedimento; existen al menos cinco factores que determinan si un cloro se puede remover de un congénere particular en cada sedimento: 1) la población microbiana presente, 2) la posición (*orto*, *meta* o *para*) del cloro en relación al anillo fenilo opuesto, 3) la configuración de cloros circundante, 4) la configuración de cloros en el anillo opuesto y 5) las condiciones de incubación (tipo de Aroclor, temperatura, disponibilidad de aceptores de electrones, salinidad, aceites, y otros contaminantes presentes (Bedard y Quesen, 1995).

El primer informe de la evidencia de la transformación anaerobia de subcompuestos formados de la degradación de BPCs lo presentaron Horowitz (1982) y Suflita et. al. (1982) utilizando consorcios microbianos aislados de lodos residuales capaces de degradar cloro benzoatos sustituidos en la posición *meta*. La reacción más interesante de transformación es la pérdida de cloro sin ruptura del anillo aromático y la dechloración ocurre sólo bajo condiciones metanogénicas. Sin embargo, ciertos microorganismos involucran sistemas enzimáticos que degradan las estructuras del anillo (Evans, 1990) y cuando todos los átomos de cloro se eliminan sucesivamente, la ruptura del anillo produce metano y dióxido de carbono (Zaitsev Karasevich, 1982).

Kong y Saylor (1983), ha reportado estudios de mineralización total (definida como la destrucción total del anillo cloro bifenílico) en el 4-clorobifenilo pero no para el 2-clorobifenilo en investigaciones llevadas a cabo con una mezcla de cultivos en sedimentos de varios ambientes naturales. Los compuestos catecol que se producen durante la biotransformación aerobia nunca se encontraron como intermediarios durante la transformación anaerobia de los anillos (Evans, 1990); incluso los pequeños porcentajes de CO₂ que se producen indican la completa mineralización del anillo de carbono.

Los microorganismos anaeróbicos utilizan BPCs como aceptores de electrones en sus procesos metabólicos de rendimiento de energía y generalmente éste es el factor más limitante para que se lleve a cabo la reacción (Kong y Sayler, 1983).

En sedimentos anaerobios reducidos, con frecuencia existe una deficiencia de aceptores de electrones (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-}) necesarios para proporcionar la donación de electrones, por lo cual, el aislamiento de cepas a partir de sedimentos contaminados con BPCs capaces de degradarlos puede ser una buena alternativa de tratamiento ya que estos microorganismos se encuentran adaptados para utilizar el BPC como aceptor de electrones en ausencia de otro aceptor disponible, (Nies y Vogel, 1990).

En el ambiente natural, los compuestos orgánicos derivados de la descomposición de los detritus proveen el co-sustrato orgánico para que se lleve a cabo la dechloración de los BPCs; análogamente, en el laboratorio la solubilización orgánica natural de los sedimentos por autoclave pueden proveer el co-sustrato orgánico para la dechloración de los BPCs (Quesen et. al., 1980).

11.5.1.1. PROCESOS DE DECLORACIÓN INDIVIDUALES

Existen por lo menos seis actividades (M,Q,H,H',N y P) por las cuales se realiza la dechloración de los Aroclors[®] que se pueden distinguir por los patrones de selectividad a cada congénere y también por su reactividad al grupo de clorobifenilo particular.

Los procesos M y N eliminan exclusivamente cloros en posición *meta* y el proceso P exclusivamente en posición *para*; los otros tres procesos de dechloración (Q, H' y H) eliminan ambas posiciones pero con distinta especificidad. La mayoría de estos procesos, están influenciados por la configuración de los cloros en el anillo atacado o del anillo opuesto, pero ninguno de estos procesos elimina cloros en posiciones *orto*.

En cualesquiera de los casos, es necesario realizar un análisis completo de cuantificación e identificación de la dechloración de los congéneres específicos y correlacionarlos con la pérdida de los congéneres específicos con el incremento de los productos generados de ellos (Bedard y Quesen, 1995).

11.5.1.2. PROCESO M

El proceso de dechloración M lo reportó Ye y Quesen (1992), con microorganismos del sedimento del Río Hudson que elimina cloros en posiciones *meta* y *para* del Aroclor[®] 1242 hasta rendir el patrón C, pero si se calienta el inóculo a 85° C se eliminan sólo cloros en posiciones *meta*. Las características de sus productos de dechloración incluyen a los congéneres 2-CB; 2,2'-CB; 2,6-CB y 2,6,2'-CB pero en menores cantidades que el patrón C, más una pequeña cantidad de 2,4-CB; 2,4,2'-CB y 2,4,4'-CB. La mayoría de los cloros eliminados fueron los sustituidos en la posiciones *meta*.

El proceso M, realiza primeramente la conversión de todos los congéneres 2,5,2'-CB y 2,3,2',5-CB a 2,2'-CB; los 3,4,2'-CB; 2,3,4-CB y 2,3,3',4'-CB a 2,4-CB; y los 2,6,3,4-CB; 2,3,6,4'-CB a 2,6,4-CB; y posteriormente los congéneres 2,5,2',5'-CB y 2,4,2',5-CB son dechlorados a 2,3'-CB y 2,4,2'-CB, respectivamente, también el 2,5,4-CB es dechlorado a 2,4-CB (Ye y Quesen, 1992; Quesen et. al., 1990). Finalmente los congéneres 2,5,3,4-CB y 2,4,3',4'-CB

son declarados a 2-4-CB y 2,4,4'-CB respectivamente sin acumulación de congéneres 2,3-CB; 2,4,3'-CB; 2,5,3'-CB ó 2,6,3'-CB.

El proceso M, también ha sido observado en sedimentos del Silver Lake con Aroclor 1242 demostrado con el congénere 2,4,2',4'-CB que también es declarado pero por un mecanismo reductivo de la posición *para* debido probablemente a la acción de una segunda población microbial que sigue al proceso M (Quesen et. al., 1990).

11.5.1.3. PROCESO Q

El proceso de dechloración Q se observó también con microorganismos del sedimento del Río Hudson. Este proceso se caracteriza principalmente por la dechloración de las posiciones *para* que resulta de la dechloración *meta* del 2,3-CB y del grupo de los congéneres 2,3,6-CB pero no de los grupos 3-, 3,4- ó 2,5-CB. El proceso de dechloración Q, remueve todos los cloros en las posiciones *para* sin tener en cuenta la configuración de cloros circundantes.

Por este proceso, el grupo de los congéneres 4-, 2,4-, 3,4-, y 2,4,5-CB se declaran por la pérdida de los cloros en las posiciones *para*. Los primeros productos de la dechloración son los congéneres 2-CB; 2,2'-CB; 2,6-CB y 2,3-CB, con menores cantidades de 2,5,2'-CB; 2,6,2'-CB; 2,5,3'-CB y 2,6,3'-CB.

11.5.1.4. PROCESO H'

Un tipo de dechloración limitada es el proceso H' propuesto por Alder, Haggblom, Oppenhermer y Young (1993) utilizando sedimentos de New Bedford, Harbor y Río Hudson (Rhee et. al., 1993^a). En este caso, la dechloración de los Aroclor® 1242 y 1254 produce solo una pequeña acumulación de 2,2'-CB pero no produce la dechloración del 2-CB. Los congéneres que se acumulan en mayor proporción son los congéneres 2,5,2'-CB; 2,3-CB; 2,4,3'-CB; 2,5,3'-CB; 2,6,3'-CB y 2,5,4'-CB; 2,4,4'-CB. Este proceso, está caracterizado por la dechloración preferente de los congéneres 2,3-; 2,3,4'- y 2,3,6-CB en las posiciones *meta* y de los congéneres 3,4- y 2,4,5-CB de las posiciones *para*.

Ahora bien, las actividades de dechloración M y Q son capaces de eliminar cloros aislados por ejemplo, cloros que no están flanqueados por otros, como el 3- ó 2,5-CB (proceso M) o en posiciones *para* de los congéneres 4- ó 2,4-CB (proceso Q). En contraste con esto, el proceso H' no elimina cloros aislados, pero si los cloros en posiciones *meta* y *para* que están colocados adyacentes a otros cloros (Bedard y Quesen, 1995).

11.5.1.5. PROCESO H

La dechloración del proceso H es muy similar a la del proceso H' excepto que no existe actividad contra los congéneres del grupo de 2,3-CB. Este proceso de dechloración, se ha demostrado en el Aroclor® 1260 con microorganismos de los sedimentos del Río Hudson (Quesen et. al., 1990; Morris, 1992a) y está caracterizado por la acumulación de los congéneres 2,5,2'5-CB; 2,3,5,2,5-CB y otros productos de dechloración que contienen congéneres del grupo

2,5-, 2,3,5- ó 2,3,6-CB; por lo que la mayor actividad de dechloración es la posición *para*, de los grupos 2,4,5-, 2,3,4,5- y 2,3,4,6-CB. Por lo tanto en los procesos H la posición que será dechlorada está determinada por la configuración más que por la localización del átomo de cloro.

11.5.1.6. PROCESO P

El proceso de dechloración P del Aroclor® 1260 es uno de las dos mayores actividades de dechloración que ocurren en los sedimentos de Woods Ponds y los observados en el laboratorio (Bedard, 1993), este proceso es similar al proceso H pero está restringido a posiciones *para*; la secuencia se inicia a partir de heptaclorobifenilos que contienen congéneres del grupo 3,4-, 2,3,4-, 2,4,5- y 2,3,4,5-CB. Sólo los cloros en posición *para* con al menos un cloro adyacente se eliminan por este proceso, además, se pueden eliminar los cloros en posición *para*, de los congéneres 3,4-, 2,3,4-, 2,4,5-, 2,3,4,5, y 2,3,4,6-CB pero no de los congéneres 4-, 2,4- ó 2,4,6-CB (Bedard, 1993).

11.5.1.7. PROCESO N

Los procesos de dechloración N fueron observados con microorganismos del sedimento de los lagos Silver Lake (Quesen et. al., 1990; Alder et. al., 1993), Woods Pond (Bedard, 1993), y Río Hudson (Rhee, 1993c). El proceso N elimina todos los cloros en posición *meta* del grupo de los congéneres 3,4-; 2,3,4; 2,3,6-; 2,4,5-; 2,3,4,5-; 2,3,4,6- y 2,3,4,5,6-CB pero no de los congéneres 3-; 2,3- ó 2,5-CB; por lo tanto, sólo los cloros en posiciones *meta* flanqueados por al menos otro cloro son eliminados por este proceso. Todos los congéneres hepta y hexaclorobifenilos y algunos pentaclorobifenilos en el Aroclor® 1260 se eliminan por este proceso y sus productos principales son tri, tetra y pentaclorobifenilos. La característica más notable de esta dechloración, es la gran acumulación de 2,4,2',4'-CB resultante de la eliminación de todos los cloros en posición *meta* del grupo de los congéneres 2,3,4,2',4',5-CB; 2,4,5,2',4',5'-CB; 2,3,4,2',3',4',5'-CB y 2,4,5,2',3',4',5'-CB la mayoría de los cuales, son componentes del Aroclor® 1260 (Bedard y Quesen, 1995).

11.5.1.8 PROCESOS COMBINADOS DE DECLORACIÓN

Experimentos realizados en el laboratorio, han demostrado la actividad conjunta de procesos M (exclusivamente dechloración de las posiciones *meta*) y del proceso Q (principalmente dechloración de las posiciones *para*) lo cual representa la acción conjunta de distintas poblaciones de microorganismos en una misma muestra de sedimento sobre el Aroclor® 1242 (Ye y Quesen, 1992; Alder et. al., 1993) dando por resultado el proceso C, el cual está caracterizado por una extensiva dechloración de las posiciones *meta* y *para* con acumulación de congéneres *orto* principalmente.

Existe también la combinación de los procesos M y H' o H en los cuales, la dechloración de las posiciones *para* de los grupos 3,4-CB típica de los procesos H y H' se realiza

conjuntamente con la decoloración de las posiciones *meta* típica del proceso M. Ahora bien, los procesos H y H' se distinguen sólo por la habilidad del proceso H para eliminar cloros en la posición *meta* de los grupos 2,3-CB; sin embargo, cuando actúan conjuntamente con los procesos M sobre el mismo grupo de 2,3-CB no es posible distinguir entre el proceso H o H'.

En consecuencia, solo los procesos Q y M son capaces de remover cloros no flanqueados como los 3- o 2,5-CB (proceso M) o 4-CB y 2,4-CB (proceso Q). La habilidad para remover cloros en posiciones *meta* o *para* de posiciones flanqueadas tales como las de los congéneres 2,3-, 3,4- 2,3,4-, 2,3,6 y 2,4,5-CB es aparentemente la más común. Por lo tanto, los procesos M y Q que decoloran un amplio rango de mono- y dicloro bifenilos son eficaces para decolorar los Aroclors 1242, 1248 y en ocasiones el 1254 debido a que estos están constituidos principalmente por mono y dicloro bifenilos; opuestamente, los procesos H, N, y P decoloran preferencialmente los anillos más clorados característicos de los Aroclors® 1254 y 1260.

Es por esta especificidad de decoloración de los procesos H, P, y N que no pueden reconocerse en sitios contaminados por Aroclor® 1242 ó 1248 y los procesos Q o M no pueden ser detectados en sitios contaminados con el Aroclor® 1260. Además, cuando los procesos Q y N se complementan y actúan sobre el Aroclor 1260 tiene mejores efectos que si actúan solos; de igual manera, lo hacen los procesos M y H'; H o P; pero en otros casos, los procesos de decoloración no se complementan y compiten entre ellos como sucede con los procesos N y P por el mismo clorobifenilo generando congéneres de los grupos 2,4- y 2,4,6-CB (proceso N) o bien 2,3-, 2,5- y 2,3,5-CB (proceso P) que no son sustratos para ninguno de los dos con lo cual, se detiene el proceso de decoloración (Bedard y Quesen; 1995).

Mavoungou et. al. (1991), ha proporcionado evidencias de que los lodos de las plantas de tratamiento urbanas pueden ser otra fuente de microorganismos capaces de decolorar BPCs como se ha demostrado en la decoloración del 4,4'-CB por el patrón Q, que no se ha podido demostrar en ningún tipo de sedimento.

11.6. FACTORES QUE AFECTAN LA TASA Y EXTENSIÓN DE LA DECLORACIÓN DE BPCs

Aunque no existen estudios detallados de los factores ambientales que influyen en los procesos de decoloración de BPCs, se ha demostrado por análisis de laboratorio, que la decoloración ocurre en combinación con procesos metanogénicos con bajo potencial de oxidación-reducción y ausencia de oxígeno (Oremland y Capone, 1988).

El efecto de la temperatura se observó más eficaz para los patrones de decoloración M y H en rangos de 12 a 30° C mientras que el patrón C ocurre a 25°.

En los estudios realizados en el sedimentos de New Bedford Harbor la decoloración ocurre a niveles de salinidad de 26 % (Alder et. al., 1993) pero a niveles de salinidad cercanas al agua marina (35%) se inhibe completamente la decoloración del Aroclor® 1242 (Abramowicz et. al., 1993).

La mayoría de los experimentos se han realizado a pH cercanos a la neutralidad; por otra parte, los microorganismos decoloradores no metabolizan los anillos de la molécula de BPCs pero

requieren otra fuente alterna de carbono la cual se obtiene de la materia orgánica presente en los sedimentos; la adición de ácidos grasos no tiene ninguna influencia en la tasa y extensión de la dechloración en los sedimentos con alto contenido orgánico. Los microorganismos dechloradores utilizan los BPCs como aceptores de electrones ya que en los sedimentos la concentración de otros aceptores está limitada (Brown et. al., 1987; Quesen et. al., 1988). Existen dos aspectos importantes por los cuales la concentración de BPCs en los sedimentos puede afectar su dechloración: la concentración mínima cercana a 20 $\mu\text{g/g}$ de sedimento y su biodisponibilidad para los microorganismos; Estudios realizados en laboratorio demostraron que los sedimentos con concentraciones de 100 $\mu\text{g/g}$ de sedimento (Abromowicz et. a., 1995) incluso de 1000 a 1500 $\mu\text{g/g}$ de sedimento fueron los más dechlorados comparados con aquellos que poseen solo del 5 al 10 $\mu\text{g/g}$ (Rhee, 1993b). Generalmente la biodegradación de los BPCs en los sedimentos está limitada por la baja biodisponibilidad debida a la fuerte absorción de éstos en la materia orgánica; para contrarrestar esto, se han aplicado surfactantes no iónicos de la serie Tritón a 600 ppm en los sedimentos del Río Hudson; el Tritón 705 es el que posee mejores resultados siendo los surfactantes iónicos como, el dodecilsulfonato de sodio (SDBS) los que inhiben completamente la dechloración (Abramowicz et. al., 1993).

La dechloración depende también de la especificidad de los congéneres presentes, tipo de microorganismos y principalmente de la inducción enzimática existente en el sedimento (Abromowicz et. al., 1993).

Muchos sedimentos que contienen contaminantes como metales pesados y aceites pueden afectar la tasa de dechloración limitando su biodisponibilidad aunado a sus características de toxicidad para los microorganismos (Boyd, 1989). Los estudios de Vogel (1986), han demostrado que la existencia de otros compuestos como acetona, relación de NO_2/CO_2 y bicarbonato pueden interferir en la extensión de la dechloración de BPCs en los sedimentos.

11.7. MICROORGANISMOS RESPONSABLES DE LA DECLORACIÓN

Gran variedad de microorganismos de sedimentos contaminados con BPCs han demostrado tener capacidad para dechlorar BPCs pero no se ha podido demostrar que la dechloración se realice por un sólo tipo de ellos ya que estos microorganismos anaerobios exhiben una extremada dependencia de interacción con otros microorganismos presentes en el sedimento; a este respecto, el equipo de investigación de Ye y Quesen (1992), ha realizado varios intentos de aislar microorganismo de sedimentos contaminados basándose en sus respuestas fisiológicas, tales aplicaciones incluyen el uso de condiciones inhibitorias y medios de cultivos selectivos demostrando que en general este tipo de microorganismos pertenece al género *Desulfotomaculum* de bacterias sulfato reductoras y formadoras de esporas que realizan la dechloración por medio del patrón M utilizando preferentemente el sulfato como aceptor de electrones; sin embargo, se piensa que existen además otros tipos de microorganismos que son responsables de la dechloración M.

Los estudios de Ye y Quesen (1994) y May (1992) sugieren que la dechloración por medio del proceso H se realiza por los microorganismos metanogénicos y no llevan a cabo la dechloración cuando en el medio existe presencia de sulfatos; sin embargo, se debe tener en cuenta que la actividad de dechloración no se efectúa por un solo tipo de microorganismos sino que

depende de la actividad metabólica de la comunidad microbiana incluyendo aquellos organismos no dechloradores (Bedard y Quesen, 1995).

La selectividad en la dechloración de los diferentes congéneres esta determinada por las diferentes reacciones enzimáticas llevadas a cabo por las diversas especies de microorganismos dechloradores de BPCs (Bedard y Quesen 1995); sin embargo, los procesos no enzimáticos también exhiben una regioespecificidad como lo han demostrado los trabajos de Roth (1994) realizados en la dechloración de BPCs por borato de níquel y el tetrakis complejo níquel (0-trifenilfosfina) y $\text{Ni(O)(PPh}_3)_4$ con los cuales obtuvo diferentes dechloraciones regioselectivas de los BPCs; la dechloración catalítica se realizó por la ruta *meta* > *orto* > *para*.

Los trabajos de dechloración mediada por enzimas, han demostrado la existencia de cofactores asociados a tales enzimas como la vitamina B_{12} y hematina que juegan un importante rol en el incremento de la actividad de dechloración biológica (Gantzer y Wackett, 1991).

11.8. CONSIDERACIONES ELECTROSTÁTICAS

En el mecanismo de transformación, los anillos de benceno poseen una basicidad tan alta que el ataque por un protón produce cargas positivas en el anillo para la adición subsecuente de los grupos hidroxilo. Muy frecuentemente, se requieren reacciones de dehidroxilación o deshalogenación para utilizar la energía de estos procesos como rendimiento energético (Evans, 1990; Nies y Vogel, 1990). A mayor número de cloros en la molécula el potencial reductivo de dechloración suele verse incrementado; y aunque en general, la dechloración anaerobia es un proceso lento con períodos que van de semanas a meses aun en condiciones de laboratorio se pueden lograr rendimientos aceptables si se consiguen las condiciones óptimas (Alder et. al., 1993).

Estudios realizados en clorobenzenos, han demostrado que termodinámicamente la energía libre disponible de la deshalogenación reductiva de los sustratos con varios halógenos unidos a un donador de electrones es más negativo (por ejemplo más exergónico) en comparación con las reacciones que involucran sustratos mono-halogenados; es decir, la reducción con hidrógeno como donador de electrones de los hexa-, penta-, y tetraclorobenzenos desprenden más energía libre (~20 kJ/mol) que la dechloración de tri-, di-, o mono-clorobenzenos y la alta energía libre asociada con estos sustratos, puede favorecer preferencialmente el desprendimiento de los halógenos de los anillos aromáticos. Por otra lado, la presencia de múltiples halógenos electrofílicos en el anillos causa un decremento en la densidad electrónica alrededor del anillo lo que lo hace más susceptible al ataque reductivo (nucleofílico) de las reacciones reductivas subsecuentes de deshalogenación (Dolfing y Harrison 1992).

Existe también, la tendencia de ciertos grupos de compuestos como las anilinas halogenadas en los cuales el grupo amino tiende a eliminar electrones de las estructuras aromáticas resonantes haciendo al anillo más susceptible al ataque, particularmente de las posiciones *orto* y *para*. Este efecto de resonancia puede contribuir a la eliminación preferencial de los halógenos de estas posiciones. De igual manera, los anillos aromáticos que poseen grupos

nitros son más fácilmente deshalogenados si éstos poseen halógenos sustituidos en las posiciones *orto* y *para* (Kuhn y Suflita, 1989).

El paso crítico en la reducción del anillo ($\Delta G^\circ (6H^A=3H_2) - 100 \text{ kJ mol}^{-1}$), es la adición de los primeros dos átomos de hidrógeno, ya que ésta es una reacción de tipo endógena ($\Delta G^\circ(2H^A=H_2) - + 60 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Evans, 1990). Los microorganismos que pueden utilizar el BPC como aceptores de electrones pueden obtener su energía del proceso de dechloración por ejemplo: la dechloración de la cadena del 3-clorobenzoato rinde mayor energía exógena derivada de la dechloración del grupo arilo ($\Delta G^\circ = - 112 \text{ kJ/mol}$) que la obtenida en el crecimiento celular a partir del benzoato (Quesen et. al., 1980).

Debido a que la estabilización de resonancia de uno de los anillos aromáticos es muy grande (163 kJ mol^{-1}) se requieren condiciones específicas para el rompimiento del anillo además de un potencial reductor extremadamente bajo; el sistema de encadenamiento caracterizado por una extensa movilización de los electrones Π se debe convertir en una movilización en la cual, una pequeña parte de la energía permanezca en el sistema y de acuerdo con esto, sólo pueden ser agregados pocos sustituyentes hidrógeno al anillo bajo ciertas condiciones.

Resumiendo, las principales ventajas de la transformación anaerobia son (Tiedje et. al., 1994):

- Reducción del número de cloros de la molécula, haciendo al producto más susceptible de ser mineralizado por microorganismos aerobios si es que el anillo no es completamente degradado por los mismos microorganismos anaerobios.
- Reducción en la toxicidad de congéneres coplanares.
- Facilidad para el establecimiento de condiciones *in situ* para la dechloración de BPCs en suelos contaminados.
- Para la dechloración reductiva no es necesaria la disposición de carbono como fuente de energía sino el aceptor de electrones (cloros).
- La dechloración reductiva consume electrones por lo cual los anillos con mayor cantidad de sustituciones cloradas representan una fuente de electrones para cualquier microorganismo que tenga capacidad enzimática para la transferencia de electrones a partir de estos compuestos.
- Aunque la dechloración reductiva es un proceso relativamente lento con rangos que van de días a semanas no se deben considerar imprácticos, especialmente en los tratamientos *in situ*.

11.9. FACTORES QUE LIMITAN LA BIODEGRADACIÓN DE BPCs EN SUELOS CONTAMINADOS

Los problemas de contaminación de suelos y sedimentos por BPCs, se pueden tratar en el mismo sitio afectado por restauración biológica. Una limitación importante de esta tecnología, es el requerimiento de condiciones adecuadas para el desarrollo de los microorganismos en los suelos afectados; el proceso involucra la aplicación de bacterias, emulsiones biodegradables y nutrientes con el correspondiente ajuste de pH del sistema.

Con estos métodos se ha observado la transformación de congéneres de BPCs de bajo nivel de cloración con un rendimiento del 90% en períodos de 15, 30 y 90 días; para los congéneres más clorados el porcentaje de transformación logra el 50% pero con períodos mayores a un año (Budiansaky, 1980).

De los estudios realizados sobre la transformación de los BPCs en sedimentos se ha determinado que ciertas propiedades fisicoquímicas del sedimento tales como los fenómenos de adsorción del BPC dentro de la matriz limitan la biodisponibilidad de éste a los microorganismos reduciéndose por ende, los rendimientos de la biotransformación anaerobia.

Otro factor que también puede intervenir en la biodisponibilidad de los BPCs y la cinética de biotransformación es el tipo de matriz existente en el sedimento (Alder et. al., 1993). El rango de la dechloración de BPC en sedimentos anaerobios se ve afectado por gran número de factores entre los que destacan los mencionados en la tabla XI-3.

Por otra parte, la existencia de grasas y aceites en el sedimento pueden incrementar la biodisponibilidad de los BPCs a los microorganismos mejorando la desorción de las moléculas del BPC cuando existe agitación (Alder et. al., 1993).

La eficacia de los procesos de restauración de sitios contaminados con BPCs, está condicionada por el conocimiento de la extensión, concentración de la contaminación y las características del sitio ya que en los suelos porosos, estos contaminantes se pueden retener por capilaridad, o bien una vez alcanzados los mantos acuíferos, debido a su alta densidad, tienden a atravesar la fase inmisible de la columna de agua y sedimentarse en el lecho rocoso o zona de baja permeabilidad como lo son las capas de arcillas del sedimento.

Existen varios estudios de biodegradación de BPCs realizados en biorreactores inoculados con asociaciones de microorganismos obtenidos de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Herbst et. al., 1977; Kaneko et. al., 1976) que degradan de las principales mezclas comerciales de BPCs que incluyen Aroclor® 1221, 1016, 1242 y 1254 (Tucker et. al., 1975).

Muchas de estas investigaciones han sido realizadas a pequeña escala y con material de laboratorio con el objetivo de reproducirlos a gran escala en sistemas de tratamiento complejos sin embargo, no han sido del todo exitosos debido a la falta y determinación de muchos factores que se deben tener en cuenta para realizar la extrapolación y el diseño del nuevo sistema de tratamiento biológico entre los que destacan a) la determinación de los procesos de eliminación abióticos como por ejemplo polimerización, cosustratos etc. b) pruebas de biotransformación o mineralización c) determinación de las variables relacionadas con los cálculos de las tasas biocinéticas (modelos matemáticos) y e) interacción de varios factores individuales relacionados con la tasas de biodegradación y biomasa que está a su vez influenciada por el diseño físico del sistema y consideraciones de balance y transferencia de masa. Por estas razones es necesario realizar experimentos a nivel de plantas piloto que permitan simular el diseño del biorreactor

Tabla XI-3.- Factores que tienen gran influencia en la biodegradación de los bifenilos policlorados (Saylor, 1984).

Consideraciones de su estructura:	
Tamaño y peso molecular	Limita el transporte activo
Naturaleza polimérica	Requiere de metabolismo extracelular
Aromaticidad	Enzimas que requiere de oxígeno en tratamientos aerobios
Número de cloros	Necesidades de enzimas deshalogenadoras
Toxicidad	Inhibición enzimática, daño celular
Origen xenobiótico	Evolución de una nueva ruta de degradación
Factores ambientales:	
Oxígeno disuelto	Enzimas sensibles al O ₂ y que requieren O ₂
Temperatura	Temperatura óptima mesofílica
PH	Cercano a la neutralidad
Fuente de carbono adicional	Co-metabolismo
Nutrientes y elementos traza	Limitaciones en el desarrollo y síntesis enzimática
Factores biológicos:	
Especificidad enzimática	Sustratos análogos no metabolizados
Enzimas codificadoras de plasmidios	Baja frecuencia de especies degradadoras
Regulación enzimática	Represión de síntesis catabólica enzimática
Competencia	Se requiere de periodos de aclimatación o inducción
Selección de hábitat	Extinción de poblaciones de baja densidad
Regulación de la población	Necesita del establecimiento de poblaciones degradadoras.
	Baja densidad de población de organismos degradadores
Métodos analíticos:	
Desaparición del sustrato	Competencia con procesos abióticos
Biotransformación	Análisis complejo y complicado
Mineralización	Rutas bioquímicas incompletas
Desarrollo de escala de reactores	Comparación entre el diseño del reactor y cinéticas
Inoculación de poblaciones	
Caracterización biológica y bioquímica	Falta de simulación y predicción de rendimiento de la degradación
Residuos complejos y aguas residuales	Dificultad de interpretación.

El gran potencial de los procesos de tratamiento biológicos, no ha sido del todo apreciado debido al incompleto entendimiento de los principios bioquímicos y microbiológicos que gobiernan las actividades metabólicas de los compuestos organoclorados

Los procesos de degradación anaerobia son de gran utilidad en los tratamientos de restauración de suelos y sedimentos contaminados con BPCs por su facilidad para eliminar átomos de cloro en las posiciones *meta* y *para* dejando la mezcla de BPCs menos tóxica, con menos cloros y más fácil de degradar por microorganismos aerobios.

Gran número de investigaciones realizadas sobre degradación de isómeros individuales utilizando cepas puras de microorganismos, han servido para establecer las rutas metabólicas de los BPCs aunque solo sean capaces de metabolizar congéneres específicos y en la mayoría de los casos son incapaces de degradar los clorobenzoatos formados como metabolitos que permanecen acumulados en el medio llegando a ser tóxico.

Aunque hasta la fecha, la degradación biológica no ha sido utilizada como método de tratamiento satisfactorio para resolver el problema que representan los BPCs, debido a sus limitaciones de aplicación sólo a bajas concentraciones, han sido de gran valor para el establecimiento de líneas de investigación y desarrollo de nuevas tecnologías basadas en la

selección de especies microbianas con gran capacidad para degradar este tipo de contaminantes, aunado al avance de la ingeniería genética que ofrece un amplio campo de aplicación de cepas adaptadas a tales compuestos. Entre las características atractivas que ofrecen estos métodos se encuentran en primer lugar, que las bacterias son inofensivas con un buen control; en segundo lugar la realización del proceso es relativamente rápida y por último, los subproductos que se obtienen de la biotransformación como el ácido clorobenzoico, pueden ser retirados fácilmente del medio o bien, degradados por una población previamente adaptada en el mismo reactor.

Por lo general, el uso de tratamientos biológicos permite llevar a cabo un proceso rentable con el que se puede disminuir la toxicidad de los compuestos organoclorados por debajo de los niveles máximos permitidos. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta ciertas consideraciones además de la estimación directa de los costos reales. El tiempo que puede dedicarse al biotratamiento, es frecuentemente uno de los elementos de mayor importancia cuando se elige un proceso en particular a utilizar.

En general, los tratamientos con reactores de biomembranas son procesos bastantes rápidos en comparación con los tratamientos convencionales que requieren mayor infraestructura y tiempo de operación. Además, los procesos con biomembranas que utilizan microorganismos seleccionados específicamente para degradar BPCs, requieren menos energía y generan menor volumen de residuos, lo que reduce de forma significativa el costo del tratamiento, permitiendo incluso, el tratamiento secuencial de los metabolitos generados llegando hasta la mineralización del contaminante.

Se necesita mucho trabajo aún para generar datos confiables a gran escala para el diseño de sistemas de tratamientos biológicos altamente eficaces para la biodegradación de BPCs. Estos deberán estar basados en estrategias operacionales que optimicen los sistemas convencionales de tratamiento y permitan el desarrollo de nuevas tecnologías con tratamientos combinados, fundamentados en estrategias de investigación multidisciplinarias basada en la caracterización, evaluación y optimización de los procesos de degradación enzimática, seguida de una fase de construcción a escala laboratorio para realizar la ingeniería de proceso tomando en cuenta el análisis detallado de los principales factores que lo gobiernan tales como: la fisiología microbiana, inducción del sustrato para el desarrollo y co-metabolismo, períodos de aclimatación previo a la actividad de degradación, balances y modelos biocinéticos que describan el funcionamiento del sistema, lo que permitirá re-valorar los procesos biológicos de detoxificación y el diseño de tecnologías de biotratamiento como procesos altamente productivos y económicamente viables de implementar a escala industrial.

Capítulo XII.

***REACTORES UTILIZADOS EN EL
TRATAMIENTO DE BPCs***

12. REACTORES UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE BPCs

En los últimos años, se han desarrollado gran variedad de tratamientos y tecnologías específicamente diseñadas para cada grupo de contaminante; siguiendo diferentes criterios para hacer la selección más apropiada dentro de los reactores aerobios, anaerobios o combinados en serie para tratar adecuadamente los bifenilos policlorados.

Un ejemplo de ellos, son los reactores convencionales de primera generación que utilizan microorganismos previamente adaptados a BPCs que incluso utilizan, un producto comercializado bajo el nombre de *Halogenated Aromatic Bacteria*, que solo requiere de la adición del sustrato adecuado (bifenilo, glucosa, acetato o metanol), para transformar un amplio rango de compuestos organoclorados; en ocasiones es conveniente la adición de carbón activado como medio de adsorción de metabolitos. Entre los factores a tomar en cuenta para la eficacia de tales procesos se encuentran la temperatura, pH, concentración de oxígeno, estructura molecular y concentración de los BPCs, co-sustratos y control metabolitos tóxicos o sustancias inhibitoras (Livingston, 1996).

12.1 REACTORES UASB

Los reactores anaerobios para el tratamiento de aguas residuales se han considerado recientemente como una tecnología con gran potencial de aplicación en el tratamiento de BPCs empleando procesos de inmovilización naturales para favorecer la retención de biomasa. Entre tales procesos, se encuentran los reactores de lecho expandido basados en el desarrollo de una película biológica que se adhiere a la superficie de material de soporte inerte, generalmente arena, carbón activado o granito para la formación de un manto de lodo granular; lo que proporciona una buena relación superficie-área, para la acumulación de la biomasa por unidad de volumen lo cual, está relacionado con el funcionamiento y eficiencia total del proceso. En ocasiones, puede no existir un soporte inerte y los gránulos de la biomasa se encuentran autosoportados.

Otro de los procesos utilizados, es el de mantos de flujo ascendente (UASB, por sus siglas en Inglés); en este tipo de procesos, los compuestos a degradar se introducen por la parte inferior del reactor y se hacen pasar a través de un lecho de lodos constituido por gránulos o partículas formadas biológicamente; el flujo ascendente se controla por la velocidad hidráulica, lo suficientemente alta para evitar el escape del medio sólido en el nivel de salida del reciclado, asegurando de esta forma, una distribución de flujo continuo dentro del reactor (Tchobanoglous, 1991).

En general, estos tipos de reactores son relativamente estables a los compuestos tóxicos y a los choques de carga, además son capaces de soportar sobre-cargas hidráulicas; pero su eficiencia depende en gran manera, de las características del lecho, la floculación de las partículas y la aclimatación de la biomasa, y para optimizar el diseño del reactor se emplea frecuentemente carbón activado granular, lo que ha demostrado ser efectivo en la remoción de sustancias tóxicas protegiendo a su vez la biopelícula. Actualmente se están desarrollando nuevas investigaciones en estos procesos con el propósito de incrementar la biomasa y a su vez, la tasa de biodegradación para minimizar con esto, el tiempo de retención hidráulico (VanDijk y Roncken, 1997).

12.2. REACTORES DE BIOMEMBRANA

Estos tipos de reactores biológicos están constituidos por dos elementos esenciales, la membrana que sirve de soporte y la biomasa adherida a ella (biopelícula) que en conjunto se denomina biomembrana y cuyo principio de operación se basa en el paso directo del contaminante a través de la membrana para ser degradados por la biopelícula adherida a ella (Tejero et. al., 1997).

Existen varias configuraciones de los reactores de biomembrana que se pueden emplear en los procesos de degradación de compuestos organoclorados. Los estudios realizados por Livingston (1995 y 1996), han demostrado que los reactores de membranas tubulares parecen ser los más efectivos por su fácil operación, alimentación y flexibilidad de instalación ya que proporcionan un eficiente proceso para la biodegradación de compuestos orgánicos poco solubles por el desarrollo de la biomasa sobre la superficie de la membrana hidrofóbica, que actúa a su vez como barrera física entre el contaminante y la biomasa, permitiendo así la dosificación del contaminante (Fonseca et. al., 1996).

En los reactores de biomembranas, la biopelícula adherida alcanza alta concentración de microorganismos biológicamente activos (debido a la gran área-superficial) con lo que se consigue un alto período de residencia celular dentro del reactor y por consiguiente, buenos rendimientos de degradación del contaminante. Los fenómenos de transferencia se dan por transporte advectivo, difusión molecular y/o difusión turbulenta, pero según la teoría de la doble capa, las resistencias difusionales más importantes se dan en la capa líquida estancada en contacto con la biopelícula y en el interior de ella, donde la transferencia se produce exclusivamente por difusión molecular; estos procesos, tienen la ventaja de soportar altas concentraciones de compuestos organoclorados por las características propias de la biomembrana; además de no requerir de periodos de aclimatación de la biomasa al contaminante ya que la difusión es relativamente lenta. Sin embargo, el rendimiento del proceso puede verse limitado por el decremento de difusión de los compuestos a degradar, transferencia de oxígeno al interior de la biopelícula y la necesidad de eliminar los subproductos tóxicos del sistema.

En este tipo de reactores, la eficiencia de transferencia de oxigenación por burbujas, es mayor que el de los sistemas convencionales con recirculación siempre y cuando se eliminen los sólidos en suspensión desprendidos por las burbujas de aire.

Ahora bien, la particularidad de los reactores con biopelículas crecidas sobre membranas tubulares, viene dada por el flujo de los elementos que intervienen en la oxidación biológica, que es de tipo contracorriente es decir, el flujo del sustrato con el flujo de oxígeno y micronutrientes son en sentidos opuestos, con respecto a las biopelículas convencionales, lo que hace que los perfiles de oxígeno y sustrato se crucen; y por lo tanto, cuando la biopelícula está parcialmente penetrada el espesor más activo de degradación, se encuentra en la capa más interna de la misma (Tejero et. al., 1997).

12.2.1 VARIABLES Y CONDICIONES QUE AFECTAN LOS PROCESOS DEL BIORREACTOR

En los reactores de biomembranas, el metabolismo de los compuestos a degradar está influenciado directamente por los detalles del diseño y operación del equipo; entre las actividades

más importantes de operación a tener en consideración el mezclado por agitación, la transferencia de gases (O_2 y CO_2) y evacuación de metabolitos tóxicos formados en el proceso son los más importantes.

Para optimizar el control de los factores y condiciones de operación de los reactores de biomembrana se debe tener presente que la eficiencia del proceso depende en gran medida del excesivo crecimiento de la biopelícula adherida a la membrana (Freitas, 1995; Livingston, 1993), lo que influye en el flujo de transferencia de masas a través de la membrana causando limitaciones de oxígeno y reducción del coeficiente de difusión del contaminante en la biomembrana, problema que puede ser solucionado eficazmente controlando el espesor de la biopelícula utilizando el corte hidrodinámico (Pey et. al., 1996) o por la adición de cloruro de sodio al medio (en concentraciones de 2 y 5%) lo que produce un efecto negativo en la presión osmótica celular (Freitas, 1996). Además, es necesario tener presente la velocidad de transporte de los reactantes y productos ya que la velocidad de reacción (consumo) del contaminante, depende tanto de su difusión como de la interacción entre la difusión y las reacciones bioquímicas producidas en el sistema microbiano (Valenzuela, 1993).

La optimización de las condiciones para el desarrollo de los microorganismos para que se lleve a cabo la biodegradación en este tipo de biorreactores, se puede realizar mediante el control de las variables que influyen en el metabolismo microbiano de los BPCs entre las que se encuentran:

12.2.1.2. pH.- La concentración del ión hidrógeno, es uno de los parámetros que influyen en la velocidad de las reacciones bioquímicas en el interior del reactor y como tales reacciones son inducidas y controladas por enzimas, el control del pH es de suma importancia durante la transformación de los compuestos aromáticos clorados ya que éstos se ven siempre acompañados por un decremento, lo que puede afectar negativamente la actividad enzimática. Por lo general, se recomiendan valores cercanos a la neutralidad (6.5 a 7.5). Sin embargo, cuando en la biomasa existen hongos se pueden mantener condiciones ligeramente ácidas. (Peys et. al., 1996).

12.2.1.3. Temperatura.- Afecta principalmente las rutas metabólicas (reacciones y tipo de enzimas) y subsecuentemente la formación de subproductos finales. La mayoría de las cepas utilizadas tienen rangos mesofílicos con temperaturas óptimas de crecimiento entre los 22 a 27 °C sin embargo, a temperaturas elevadas se obtienen algunas ventajas en la degradación por el incremento de la velocidad metabólica.

12.2.1.4. Oxígeno.- Durante el tratamiento aerobio de los compuestos organoclorados se remueve la materia orgánica mediante oxidación y conversión en materia celular. El oxígeno debe proporcionarse continuamente durante el proceso, ya que éste actúa como el aceptor final de hidrógeno para las reacciones de oxidación y se utiliza además para la síntesis celular.

12.2.1.5. Concentración de BPCs como sustrato.- La biodisponibilidad del sustrato es un requisito para que se realice la degradación y puede ser un factor limitante por lo cual, es recomendable garantizar su adecuada concentración; ahora bien, los microorganismos no siempre metabolizan los compuestos organoclorados como la única fuente de carbono y energía por lo que en ocasiones, requieren de fuentes de carbono adicionales en el medio

como ejemplo glucosa, acetato, metanol y ácidos orgánicos para estimular el desarrollo de la biopelícula y favorecer la degradación de los compuestos aromáticos clorados.

12.2.1.6. Formación de subproductos.- Existen varias rutas por las cuales los subproductos formados pueden fugarse del reactor provocando errores en el proceso de cuantificación: la volatilización a través de burbujas de aire, sorción y oxidación química, los cuales deben ser monitoreados en conjunto durante la operación del biorreactor, mediante el análisis estequiométrico previo; verificando también, la eliminación de los subproductos en los estudios de biodegradación por medio de las pruebas de mineralización basadas en el balance de masas de reactivos y productos; específicamente, en el caso de biodegradación de compuestos organoclorados es de vital importancia el monitoreo de dióxido de carbono y cloruros formados (Livingston, 1993).

Para comprender la compleja operación de los reactores de biomembranas, es necesario realizar un análisis detallado de la estructura y cinética de biodegradación dentro de la biopelícula, teniendo en cuenta el tipo y estructura de la membrana en la eficiencia del proceso de degradación con el objetivo de optimizar el diseño y operación del reactor (Bishop, 1997).

12.3. BIOPELÍCULAS

La biopelícula, es la capa formada por la fijación de la biocenosis sobre la superficie de la membrana como medio de soporte en un medio acuoso, caracterizado principalmente por la gran acumulación de biomasa y en el que los compuestos, penetran a sus interfaces donde los microorganismos realizan el bioatrapamiento por medio de la producción de polímeros extracelulares formando una matriz de polisacáridos de estructura porosa, en los que las partículas y/o sustancias solubles de menor tamaño que los poros, se mueven libremente mientras que las de mayor tamaño permanecen agregadas entre ellas y unidas a la matriz (Eguía, 1991). Los poros de la matriz facilitan además, el transporte de oxígeno desde el seno del líquido a través de la biopelícula (DeBeer, 1994). En el modelo más comúnmente utilizado, se asume que los sustratos, y aceptores de electrones se difunden desde el seno del líquido al interior de la biopelícula en donde se utilizan para el metabolismo microbiano (Bohlood y Kinner, 1986).

Por mucho tiempo, se había asumido que la biopelícula era estructuralmente homogénea y que sus propiedades de porosidad, tamaño de poro, distribución, densidad y población microbiana variaba muy poco con la profundidad. Se asumía también, que el crecimiento de la biopelícula se realizaba sólo por la adherencia de las bacterias a la superficie del soporte y crecían libremente a lo largo del soporte, incluso que las colonias crecían juntas y continuaban su crecimiento encima de la capa de exopolisacáridos, incluso, podrían existir pequeñas heterogeneidades locales debido al tipo de polisacáridos que englobaban a los microorganismos, pero en general, la biopelícula se asumía como una superficie continua y esencialmente homogénea con pequeños poros debido al desprendimiento de gases y al incompleto llenado de la superficie de soporte por falta de crecimiento celular; pero estos poros eran de diámetro muy pequeño para tenerse en cuenta. Con base en esto, los modelos de transporte más comúnmente utilizados en biopelículas se desarrollaron bajo la suposición de que las propiedades en todo el espesor eran constantes. Sin embargo, muy recientemente, con el estudio de microscopía óptica de barrido electrónico se ha demostrado que esta teoría de biopelícula de estructura homogénea no es correcta (Bishop, 1997).

Estas investigaciones, sugieren que las biopelículas están caracterizadas por gradientes constituidos por diferentes tipos de células y parámetros fisicoquímicos, y como resultado de estos gradientes las especies microbianas, la densidad, porosidad y la tortuosidad de la biopelícula cambian conforme se incrementa el espesor y por ende, afectan los mecanismos de transporte y difusión dentro de ella (Sun, 1989; Fan, 1990; Kitsos, 1992; Fu, 1993; Zhang, 1994). Además, debido a su alto contenido de polímeros extracelulares, se ha demostrado que la biopelícula es una estructura viscosa, elástica y muy hidratada, (Characklis y Wildered, 1989; Characklis, 1990; Trulear, 1982) y su composición inorgánica (P, Mn, Ca, etc.) influye notablemente sobre sus propiedades físicas, proporcionando por ejemplo, una mayor resistencia mecánica a la ruptura por formación de enlaces quelantes cuando dentro de ella existe calcio. (Characklis y Wildered, 1989; Characklis, 1990).

En general, en un sistema de biopelícula se pueden diferenciar varias partes: el soporte, biopelícula, la fase líquida y la fase gaseosa, a su vez en la biopelícula, se pueden diferenciar dos capas: la biopelícula base y la capa superficial (Tejero et. al., 1994).

El soporte en este caso la membrana, juega un papel muy importante durante las primeras etapas de su colonización y puede influir tanto en la velocidad de acumulación como en la distribución de la población inicial de células.

En la biopelícula, la capa base es una estructura organizada con límites relativamente bien definidos en los que el transporte molecular es el fenómeno predominante. La biopelícula superficial es una capa de transición entre el seno del líquido y la biopelícula base, en el cual el transporte advectivo es el fenómeno principal (Charalakis y Wildered, 1989).

Entre las propiedades más importantes en el desarrollo de la biopelícula en relación con el soporte, se encuentran los factores de la acumulación que puede llevarse a cabo por dos procesos:

- *Los fenómenos electrostáticos* por los cuales, los microorganismos se consideran como partículas con carga provocada por la disociación eléctrica de radicales amino, carboxilato y fosfato que pueden verse afectados por el pH del agua. En un medio acuoso neutro, los microorganismos actúan como partículas con carga eléctrica negativa y la superficie del soporte actúa con carga eléctrica positiva, lo que permite que las fuerzas electrostáticas existentes entre ellos originen la adhesión de las células microbianas al soporte (Iwai y Kitao, 1994).
- *La adsorción de los microorganismos* al soporte se lleva a cabo también por la interacción hidrofóbica característica de la mayoría de los microorganismos. Por tanto, el crecimiento de la biopelícula se debe al efecto combinado de reproducción celular y producción de exopolímeros que ayudan a mantener unidas a las células entre sí y al medio de soporte.

Ahora bien, el desarrollo de la biopelícula, comprende esencialmente tres fases:

- ◆ *Fase de inducción*, que comprende la adsorción orgánica, seguida del transporte y adhesión de los microorganismos sobre el soporte; en esta fase la biopelícula es muy delgada.
- ◆ *Fase de acumulación*, donde se presenta un incremento logarítmico de la población de

microorganismos con una tasa de acumulación casi constante. El crecimiento alcanza un espesor crítico de biomasa y la adición extra de sustrato no afecta el crecimiento; en este punto, Iwaki y Kitao (1994) proponen una fase de mantenimiento celular, alcanzando un balance entre la tasa de consumo y el suministro de sustrato.

- ♦ *Fase de desarrollo de la biopelícula*, es el resultado de varios sucesos simultáneos por los cuales la biopelícula sigue creciendo y por ende aumentado su espesor y densidad cuando su tasa de crecimiento es superior a la tasa de desprendimiento (Valenzuela, 1993). Se alcanza un equilibrio dinámico, cuando la película biológica desprendida y la producida, interaccionan debido a los siguientes factores: respiración endógena, destrucción de la cadena trófica, lavado por esfuerzo cortante y muerte celular (por limitaciones de oxígeno y/o nutrientes en las capas profundas de la biopelícula) (Salazar, 1994).

Por otra parte, durante el proceso de colonización y formación de la biopelícula, sobre el medio de soporte, se pueden definir las siguientes etapas (Characklis, 1990):

- ♦ Acondicionamiento del medio de soporte por absorción de moléculas orgánicas sobre la superficie.
- ♦ Adhesión de células microbianas desde el seno del líquido al medio de soporte acondicionado.
- ♦ Adsorción reversible, parte de las células que llegan al soporte se adhieren a él por un tiempo limitado, separándose posteriormente (desorción) debido a la fuerza cortante del fluido y diferentes factores fisicoquímicos y biológicos.
- ♦ Adsorción irreversible, parte de las células adsorbidas, quedan inmovilizadas permanentemente.
- ♦ Acumulación de la biopelícula, por incremento del metabolismo microbiano a expensas del sustrato y excreción de sustancias poliméricas como subproductos que quedan constituyendo parte de la biopelícula.
- ♦ Atrapamiento, por adhesión de más células microbianas y material particulado dentro de la biopelícula.
- ♦ Separación de parte o porciones de la biopelícula que vuelven al agua debido al esfuerzo cortante producido por el movimiento del fluido (erosión), acción mecánica de otras partículas que chocan contra la biopelícula (abrasión) y/o desprendimiento de capas de biopelícula (desprendimiento masivo) por la pérdida de cohesión o adherencia.

Entre las principales características de las biopelículas la concentración de sólidos, espesor, biología, transporte y asimilación del sustrato son las que condicionan el funcionamiento de un proceso de degradación de contaminantes que puede variar en función de las condiciones del proceso (Characklis y Wildered, 1989 y 1990; Atkinson y Davies, 1974).

12.3.1. ESPESOR DE LA BIOPELÍCULA

Los espesores de las biopelículas, varían considerablemente debido a sus características morfológicas (Bakke, 1986) con rangos desde prácticamente el tamaño de las células (1-10 μm) en una biopelícula en formación, hasta más de 15 mm. En los procesos de biopelícula aerobios, los valores normales oscilan entre 100 μm a 5 mm (Tejero et. al., 1995).

Se distinguen además, dos tipos de espesores en la biopelícula, total y activo; el espesor

total oscila entre 0,07 y 4 mm (Atkinson y Davies, 1974). El espesor activo o capa activa se puede definir como aquél en el que la concentración de nutrientes es superior a cero, evidenciado por los cambios en la tasa de asimilación de sustrato; es decir, en función de la profundidad de la biopelícula, la tasa de consumo de sustrato se incrementa. Jenkins (1963), ha sugerido que con espesores de 0,25 mm se obtiene la máxima eficiencia de remoción de sustratos. Sin embargo, algunos investigadores, han demostrado que la eliminación de sustrato, se incrementa linealmente con el aumento del espesor de la película hasta un máximo donde permanece constante (Tomlinson y Snaddon, 1996; Kornegay y Andrew, 1968; La Mota, 1976 citado por Eguía, 1991).

Ahora bien, de una película de varios milímetros solo una capa de 0,05 a 0,15 mm de espesor podrá ser aerobia (Eguía, 1991). En procesos metabólicos aerobios con altas concentraciones de sustrato, la tasa de difusión de los nutrientes orgánicos en la biopelícula es más rápida que la del oxígeno, por lo tanto la profundidad de la capa activa, estará determinada por la profundidad de penetración del oxígeno; siendo éste el factor limitante de la tasa.

El espesor de la biopelícula es a menudo, una característica importante en los procesos de análisis de la biopelícula ya que conociendo el espesor, se puede calcular la longitud difusional, la resistencia por fricción y la transmisión de calor dentro de la misma (Characklis y Wildered, 1989). Las biopelículas gruesas son menos aptas para realizar eficientemente la eliminación del sustrato y por el contrario, las biopelículas delgadas contribuyen eficazmente ya que no opone resistencia a la difusión.

La variación en el espesor, está en función de la edad de la biopelícula además del tipo de especies de microorganismos presentes, de tal manera que en biopelículas con monocultivos alcanzan espesores de 50 μm (Bakke, 1986), mientras que con poblaciones mixtas, se consiguen espesores hasta de 120 μm (Characklis, 1980). Otros factores que pueden influir en el espesor de una biopelícula son: carga orgánica aplicada, esfuerzo cortante al que está sometida, tipo de sustrato, pH, temperatura, resistencia de la biopelícula y rugosidad del soporte; ahora bien, ya que el espesor también depende de la hidrodinámica del medio; el efecto cortante del fluido puede ser un buen método para controlarlo.

12.3.2. CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS DE LA BIOPELÍCULA

La concentración de sólidos de las biopelículas varía desde valores de 10 kg/m^3 hasta valores cercanos a 130 kg/m^3 (Characklis, 1990; Kornegay y Andrews, 1976; Hoehn y Raym 1973). Si se analiza la concentración de sólidos por capas, se pueden observar variaciones aún mayores del orden de los 147 kg/m^3 (Iwai y Kitao, 1994).

Las investigaciones realizadas con técnicas de microsección han demostrado que la concentración de sólidos se incrementa con la profundidad y la porosidad cambia desde un rango de 84 a 93% de poros en la capa superficial, hasta rangos de 68 a 67% en las capas más profundas; además, el tamaño de poro disminuye en las capas más profundas desde 2.0 μm en la capa superficial hasta 0.3 μm en la capa más profunda (Bishop, 1997) y la mayor densidad se encuentra en las capas próximas al soporte. Se piensa que los cambios de densidad se deben a las variaciones de las poblaciones microbianas dentro de la película.

La densidad de la biopelícula puede ser significativamente alta en ambientes que contienen partículas suspendidas de sales inorgánicas insolubles que quedan integradas en la biopelícula (Characklis, 1989); la concentración de sólidos puede incrementarse también con la carga orgánica afluyente, ya que se incrementa también la concentración y penetración de sustrato.

12.3.3. BIOLOGÍA DE LAS BIOPELÍCULAS

Las biopelículas están constituidas principalmente por mezclas de poblaciones de bacterias, hongos, rotíferos etcétera o bien, cepas puras de microorganismos aerobios o anaerobios que utilizan glucosa (Lorda, 1994), acetato, metanol, incluso, compuestos xenobióticos como bifenilos y BPCs como fuente de carbono.

El tipo y distribución de microorganismos en la biopelícula depende básicamente del tipo y concentración del sustrato disponible en el medio; en los procesos de biopelícula las bacterias son las que inician la fijación sobre el soporte, cuando se encuentran en un medio con abundantes nutrientes orgánicos y buena disponibilidad de oxígeno.

El proceso de fijación se inicia cuando los microorganismos comienzan a secretar polímeros extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés) que los va uniendo, tejiéndose así la biopelícula; con el incremento del espesor de la biopelícula se van desarrollando en ella otras poblaciones de bacterias y hongos, esta disposición de microorganismos está influenciada por la concentración de oxígeno, tipo y flujo de sustrato aplicado en contracorriente o co-corriente lo que favorece el desarrollo de uno u otro microorganismo (Tejero, 1994); de tal manera que las células quedan unidas en disposiciones geométricas complejas con distribución espacial; por lo que no se pueden separar ni por el transporte de los sustratos o productos generados, ni por las reacciones provocadas por los mismos microorganismos.

12.3.4. TRANSPORTE Y REACCIONES EN LA BIOPELÍCULA

El estudio de los diferentes procesos de transporte en la biopelícula son de vital importancia para cuantificar la dirección y los procesos de transferencia de masa al interior del sistema. La difusión molecular, la difusión turbulenta y el transporte advectivo son los principales procesos de transporte en estos sistemas y la suma de ellos, representa el transporte de masas total en la biopelícula (Characklis y Wildered, 1989).

Al analizar los perfiles de concentración de oxígeno externo e interno en la biopelícula, se aprecia el efecto de los fenómenos de transporte externos, ya que al cambiar la velocidad del fluido cercano a la biopelícula cambia también la tasa de oxigenación y asimilación del sustrato (Chen y Bengay 1989). Ahora bien, el espesor activo de la biopelícula depende de la capacidad de reacción de ésta, la cual está en función de la concentración y difusión del sustrato (Salazar, 1994).

Para determinar la penetración de oxígeno en la biopelícula, recientemente se han utilizado microelectrodos que han demostrado variaciones que dependen de la estructura de la biopelícula, tasa de asimilación del sustrato, concentración de oxígeno disuelto en el medio, tipo de microorganismos y presencia de metabolitos tóxicos; llegándose a medir variaciones en la difusibilidad efectiva (D_e) dentro de la biopelícula del orden de 90% en la interfase líquido-

biopelícula y hasta de 25% en la capa interna; lo que confirma que la biopelícula no es homogénea (Fu, 1993; Zhang y Bishop, 1994).

Por otra parte, las reacciones que se producen en la biopelícula dependen de los tipos de microorganismos presentes o más exactamente, de los sustratos que condicionan el desarrollo de microorganismos específicos; por lo tanto, el punto principal para la modelización de una biopelícula se encuentra en conceptualizar la expresión matemática de los fenómenos de transporte y reacción simultáneas que se suceden en ella (Zamora, 1996).

12.3.5 ASIMILACIÓN DEL SUSTRATO

En el análisis de las reacciones que ocurren en los reactores de biomembrana, el sustrato a ser degradado pasa a través de la membrana hacia el interior de la biopelícula por diferencia de concentración a medida que los microorganismos lo van metabolizando. Por otra parte, la biopelícula consume del seno del líquido micronutrientes, oxígeno y elementos traza que una vez puestos en contacto con ella, se transportan al interior por difusión molecular y posteriormente se utilizan en la síntesis celular, finalizando el proceso con la transferencia y eliminación de los productos finales del metabolismo a la fase líquida del reactor.

Cuando en los contaminantes utilizados como sustrato existe deficiencia de algún elemento esencial para los microorganismos, el elemento agotado es el que determina el espesor activo o capa activa de la biopelícula por lo que se convierte en el factor limitante. Sin embargo, como en la mayoría de los reactores aerobios el oxígeno se encuentra en menores concentraciones en el seno del líquido que en los sustratos, se convierten en el factor limitante, por lo que es recomendable mantener la disponibilidad de oxígeno en el medio mediante burbujeo o agitación mecánica (Vidart, 1992; Salazar, 1994).

12.4. MODELOS DE TRANSFERENCIA DE MASA

Los modelos matemáticos de transferencia de masa intentan describir el efecto que tiene el cambio de las condiciones intrínsecas de la biopelícula sobre la capacidad de asimilación del sustrato, expresado en términos de flujo y cantidad de sustrato en la interfase biopelícula-líquido.

La mayor parte de los modelos planteados tratan a la biopelícula como un conjunto homogéneo, es decir asumen una distribución uniforme de sus propiedades y por lo tanto no representan el fenómeno real; básicamente consideran que las relaciones dentro de la biopelícula siguen cinéticas simples de *Monod* y *Blackman* (figura XII-1). Todos los modelos existentes, son muy parecidos y cada uno suele introducir ligeras modificaciones sobre los anteriores para considerar fenómenos específicos (Eguía, 1991); aunque existen algunos modelos más completos que consideran los cambios integrales dentro de la biopelícula, modelando la distribución espacial de los tipos de microorganismo que constituyen la biopelícula (bacterias heterótrofas, nitrificantes y desnitrificantes), considerando para ello perfiles de los sustratos amonio, nitrato, nitrito, oxígeno y carbono orgánico (Chen, 1989; citado por Valenzuela, 1993). Estos modelos se pueden combinar con el modelo conjunto de funcionamiento del reactor, con el fin de proporcionar una descripción de la eficiencia de eliminación del contaminante.

El *modelo de Monod*, es el más empleado para describir la eliminación de la materia orgánica soluble y la oxidación del nitrógeno en los reactores de película fija, bajo la condición de que el aceptor de electrones esté presente en concentración limitada según la siguiente expresión (Vidart, 1992):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{S + K_s}$$

Donde:

μ_{\max} = Tasa de crecimiento específico máximo de las bacterias.

S = Concentración del nutriente limitante.

K_s = Coeficiente de semisaturación para O_2 o sustrato.

El *Modelo de Blackman* es muy utilizado en los sistemas de películas fijas siempre que sean altas las concentraciones de donador y aceptor de electrones.

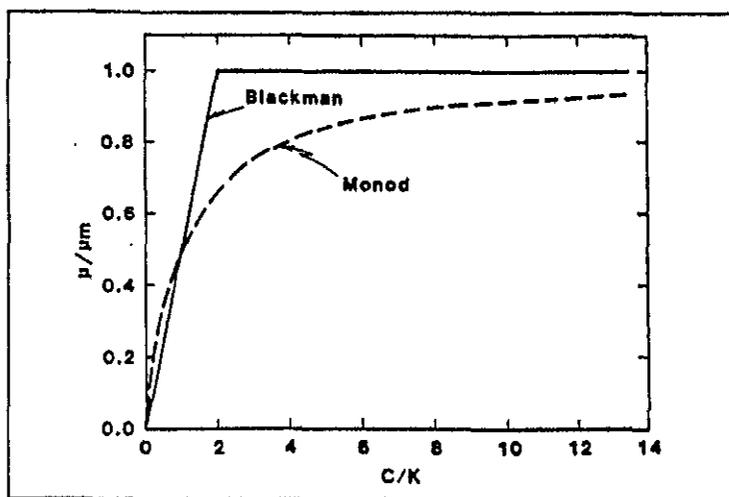
$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{2 K_s}$$

para $S < 2K_s$

$$\mu = \mu_{\max}$$

para $S > 2K_s$.

Fig. XII-1.- Comparación gráfica de los modelos de Monod y Blackman (Zamora, 1996)



12.4.1. ANÁLISIS DE LA TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN LA BIOPELÍCULA

La transferencia de oxígeno es un proceso físico que ocurre en dos etapas; en la primera, la capa de oxígeno se disuelve en la capa del líquido para formar una capa relativamente concentrada denominada interfase gas-líquido, definida como la película de líquido en contacto con la película de gas (Lewis y Withman 1992 citado por Osa, 1995); en la segunda fase, ocurre la transferencia desde ésta etapa a todo volumen del líquido por difusión molecular, turbulencia y/o advección (Winkler, 1986; Osa, 1995). Cuando la solubilidad del oxígeno en el agua es muy baja, se supone que el proceso total de transferencia esta controlado por la segunda etapa es decir, por la transferencia de la capa de interfase gas-líquido al seno del líquido. Operando en términos de la concentración de oxígeno disuelto y considerando que el coeficiente de actividad no cambia entre la interfase y el volumen del líquido, el flujo másico de oxígeno se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

donde:

N_A = Flujo másico de oxígeno
 K_L = Coeficiente de transferencia de masas en la fase líquida.
 C_i = Concentración de oxígeno disuelto en la interfase.
 C_L = Concentración de oxígeno disuelto en volumen de líquido.

$$(12.1) \quad N_A = K_L (C_i - C_L)$$

Generalmente, la concentración interfacial se supone como el valor de equilibrio o saturación del oxígeno disuelto que está en equilibrio con la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa, según la *Ley de Henry*, por lo tanto:

donde:

C^* = Concentración de saturación

$$(12.2) \quad N_A = K_L (C^* - C_L)$$

dada por :

donde:

P_B = Presión parcial de oxígeno.
 H_C = Constante de la ley de Henry.

$$(12.3) \quad C^* = P_B / H_C$$

Al considerar la transferencia de oxígeno a un volumen de líquido "V" que tiene un área interfacial "A" en contacto con la fase gaseosa se tiene la tasa de transferencia al líquido, "M_C" por unidad de tiempo:

$$(12.4) \quad M_C = N_A \cdot A = K_L \cdot A (C^* - C_L)$$

Por lo tanto, la tasa de transferencia de oxígeno (TTO) por unidad de tiempo, por volumen unitario del líquido, esta dada por:

$$(12.5) \quad TT0 = \frac{A}{V} (C^* - C_L) \quad \text{donde: El coeficiente } A/V \text{ se conoce como superficie específica, "a"}$$

Por lo tanto:

$$(12.6) \quad TT0 = K_{La} (C^* - C_L) \quad \text{Al factor } K_{La} \text{ se le conoce como "Coeficiente volumétrico de transferencia de masas".}$$

La tasa de transferencia de oxígeno varía con la concentración del oxígeno disuelto en el volumen del líquido C_L de tal manera que el valor de K_{La} proporciona una guía útil para determinar la eficiencia de oxigenación bajo condiciones específicas, y es independiente de la concentración de oxígeno disuelto. A este respecto, se han desarrollado algunos modelos teóricos para explicar el proceso de transferencia desde la capa interfacial rica en oxígeno hasta el volumen de solución:

Según la primera *Ley de Difusión de Fick*, el flujo de masa N_A del oxígeno a través de un área unitaria en la unidad de tiempo, es proporcional al gradiente de concentración de oxígeno normal a dicha área, $\partial c / \partial y$ y la constante de proporcionalidad se conoce como el " Coeficiente de Difusión". D_c , por lo tanto:

$$(12.7) \quad N_A = - D_c (\partial c / \partial y) \quad \begin{array}{l} \text{donde:} \\ c = \text{Concentración de oxígeno disuelto} \\ y = \text{Dimensión lineal normal del área considerada.} \end{array}$$

El signo negativo indica que la dirección del flujo es en dirección al gradiente de concentración.

Por otro lado Lewis y Whitman (1992), propusieron un modelo en el que existe una película de líquido adyacente en la interfase del gas-líquido en la cual, en el que la concentración de oxígeno disuelto decrece uniformemente hasta un cierto valor que corresponde con en el volumen de líquido, de tal manera que el gradiente de concentración en esta película será:

$$(12.8) \quad (\partial c / \partial y)_{\text{película}} = (C_1 - C_L) / y_i \quad \text{donde: } y_i = \text{espesor de la película.}$$

Al comparar las ecuaciones (12.1) y (12.8), el coeficiente de transferencia de masa de la fase líquida, K_L es directamente proporcional al coeficiente de difusión "Dc" del oxígeno en el líquido. Ahora bien, un incremento en la turbulencia puede conducir a una mayor difusión del espesor de la película "y_i", e incrementos del gradiente de concentración y la tasa de transferencia de oxígeno (Zamora, 1996); es decir, en los procesos de biopelícula, la capacidad de oxigenación se incrementa al aumentar la agitación del seno del líquido o la presión parcial de oxígeno (Tejero et. al., 1997).

12.4.2. FACTORES DE LA TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Existen varios factores que pueden influir en la transferencia de oxígeno cuando se utilizan sistemas de difusores; el tamaño de la burbuja y la mezcla en el reactor son los más importantes pero a su vez, están influenciados por la presencia de tensoactivos, sales minerales, composición del medio, etc.

12.4.2. 1. AGENTES TENSOACTIVOS

La adsorción de surfactantes en la superficie de la burbuja reduce la tensión superficial lo que da lugar a un área interfacial específica gas-líquido mayor para la transferencia de oxígeno.

En los reactores biológicos, la concentración de surfactantes puede verse incrementada o disminuida dependiendo de los efectos combinados de producción y/o eliminación de biosurfactantes por los microorganismos y por consiguiente la velocidad de la tasa de asimilación de oxígeno puede cambiar ya que los surfactantes absorbidos en la biopelícula, (especialmente macromoléculas) disminuyen el coeficiente de transferencia de masas (K_L) por el efecto de disminución que ejercen sobre la movilidad de la burbuja en la superficie y la formación de una zona de surfactante interfacial menos permeable.

12.4.2.2. ELIMINACIÓN DE SALES MINERALES

Con la disminución de la fuerza iónica del medio acuoso se incrementa el diámetro de burbuja (disminuyendo el área interfacial específica gas-líquido) debido al incremento de la velocidad de la burbuja atribuida a su vez, a las fuerzas de repulsión electrostáticas más débiles generadas por los potenciales de superficie (Keitel, 1982; Robinson, 1974; Zieminski, 1971).

12.4.2.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS CÉLULAS

Según Andrew (1980), las células consideradas como partículas sólidas pueden cambiar la hidrodinámica que se genera alrededor de la interfase gas-líquido; se ha demostrado también que la eficiencia de colisión de varias células unidas con una burbuja es mayor cuando la interfase de la burbuja es móvil; por lo tanto un incremento de la colisión permite una mayor unión de las células de la interfase con mayor arrastre y mayor movimiento interfacial; este fenómeno llamado efecto "bola de nieve" (Snowball effect) puede generar un valor mayor de K_L y por consiguiente un incremento de la transferencia de oxígeno. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que las células acumuladas en la interfase pueden retardar el transporte de oxígeno por un mecanismo de bloqueo, originando una penetración más lenta del oxígeno en la capa activa de la biopelícula (Bungay y Masak, 1981).

12.4.2.4. RESPIRACIÓN DE CÉLULAS EN LA INTERFASE GAS-LÍQUIDO

Se han propuesto varias teorías para explicar el efecto de la respiración de las células absorbidas en la interfase: por una parte, el oxígeno puede ser transferido directamente desde la

burbuja a los microorganismos acumulados en la interfase gas-líquido (Bartholome, 1950); pero se debe tener en consideración también, que la resistencia de la transferencia de masas asociada con la capa líquida que rodea a la burbuja y las células, se ve reducida debido a que las burbujas se absorben sobre las células con la consiguiente unión de las capas líquidas estancadas (Bennet, 1964; Alberston y DiGergorio, 1975). A este respecto, Tsao (1968) ha postulado que el consumo de oxígeno por las células acumuladas en la zona líquida adyacente a la interfase gas-líquido, se debe a los gradientes excesivos de concentración en la cercanía de la interfase. Por otro parte, los incrementos en el área de la biopelícula y de la tasa de difusión de oxígeno, conllevan a un incremento de la transferencia interfacial debido al contacto directo entre las burbujas de gas esparcidas y la capa activa de la biopelícula. Ahora bien, el incremento en la tasa de asimilación del sustrato incrementa también, la transferencia interfacial de oxígeno, pero sólo hasta un cierto valor que corresponde a una tasa de difusión específica y superando este punto ya no existen incrementos en la transferencia interfacial de oxígeno (Reiber y Stensel, 1985 citado por Osa, 1995).

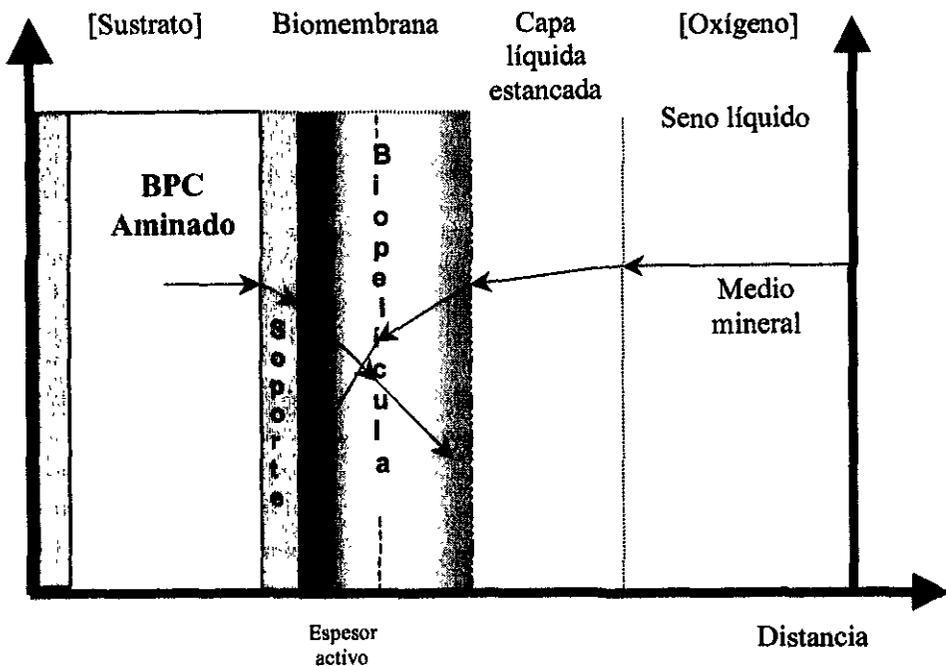


Fig. No. 2.- Perfiles de sustrato y oxígeno en una biopelícula de soporte permeable

Resumiendo, en un reactor con mezcla, la concentración de oxígeno y micronutrientes se mantiene constante en todo el seno del líquido, disminuyendo a medida que atraviesa la capa líquida estancada y la biopelícula; ahora bien, puede diferenciarse entre biopelícula totalmente penetrada cuando la concentración del medio y oxígeno se difunden hasta el soporte y en el caso contrario biopelícula parcialmente penetrada, que puede estar delimitada a un espesor activo de la capa externa y la biopelícula base, el espesor activo es el que lleva a cabo la biodegradación y es

a través del cual, se difunde el sustrato y oxígeno de manera cruzada (Figura 2). Sin embargo, el espesor hasta el cual se difunde el sustrato es mayor que la del oxígeno, dado que la concentración de éste es mucho menor en el seno del líquido aún y cuando las resistencias difusionales son las mismas; por lo tanto, el que una biopelícula se encuentre total o parcialmente penetrada depende del espesor de la misma (Tejero et. al., 1997).

12.5. MEMBRANAS COMO MEDIO DE SOPORTE DE LA BIOPELÍCULA

Las membranas de acuerdo a su estructura pueden ser porosas o compactas, homogéneas o heterogéneas, simétricas o asimétricas, y de acuerdo a su carga eléctrica pueden ser neutras o cargadas. La interacción soporte-microorganismo con membranas es inmediata cuando la superficie está cargada positivamente.

Las membranas cargadas eléctricamente están constituidas por diafragmas porosos denominados sistemas intercambiadores o selectivos; los gradientes de concentración a través de una membrana además de dar lugar al flujo de materia, puede causar una diferencia de presión bajo ciertas condiciones desencadenando un proceso de ósmosis. Las membranas son por lo general de polímeros sintéticos. Las membranas selectivas, poseen carga eléctrica en su superficie (caras externas y paredes de los poros); cuando éstas son positivas, la membrana se denomina intercambiadora de aniones, y cuando los grupos cargados fijos a la membrana son de tipo aniónico, la membrana se llama entonces intercambiadora de cationes.

Las membranas hidrofóbicas tubulares se utilizan para inmovilizar la interfase de contacto entre la fase orgánica y la acuosa; la posición de la interfase acuosa-orgánica está asimismo controlada por las presiones de ambas fases.

Las fases pueden pasar a través de la membrana mediante disolución en una de las caras de la membrana con posterior liberación y disolución en la otra fase o bien, pasando a través de los poros de la estructura interna de la membrana. En cualquier caso, el proceso está gobernado por las propiedades tanto de la membrana como de las características de las soluciones en contacto con ella (Urriaga, 1991).

12.5.1. PROPIEDADES DE LA MEMBRANA

Las propiedades físicas de las membranas, en virtud de su forma y configuración juegan un papel esencial en la transferencia de oxígeno, sustrato y en las características hidráulicas del reactor, por lo que cuanto mayor sea la superficie de la membrana como medio de soporte en los reactores mayor será el rendimiento, ya que el intercambio superficial es proporcional a la superficie específica de la membrana (Eguía, 1991).

Especialmente importantes son las características de conformación de la membrana ya que tienen influencia directa sobre el tipo de microorganismo que coloniza su superficie debido a su efecto electrostático sobre la velocidad de acumulación y distribución inicial de la población (Valenzuela, 1993). En principio es deseable una gran adherencia de los microorganismos a la membrana, pero esto puede traer consigo problemas de atascamiento por sobreacumulación de la

misma.

Daniels (1971), ha propuesto varios factores que afectan la adherencia de los microorganismos sobre la membrana entre los que destacan:

- *Características de la membrana (soporte).*- Tipo, forma iónica, propiedades específicas, rugosidad, interacciones soporte-célula y soporte-líquido y radio de curvatura.
- *Características de los microorganismos.*- Tipo de especies, medios de cultivo, edad del cultivo, medio de suspensión, concentración, propiedades superficiales, interacciones célula-célula e interacciones célula-soporte.
- *Características del medio.*- pH, concentración, composición, agitación, tiempo de retención, temperatura e interacciones líquido-soporte y líquido-célula.

12.5.2. MEMBRANAS DE SILICONA

Otra de las características importantes a tomar en consideración, es el material con que están fabricadas las membranas; el uso de membranas de silicona para el tratamiento de compuestos orgánicos ha sido reconocido como una tecnología competitiva y más eficaz que los reactores convencionales ya que el contaminante no se encuentra en contacto directo con los microorganismos (Brookes, 1994).

Las membranas hidrofóbicas de silicona, están constituidas con fibras huecas de diámetro pequeño que les proporciona un área superficial considerable por unidad de volumen y tienen la ventaja de ser muy permeables y altamente selectivas a varios hidrocarburos volátiles clorados y a gran variedad de compuestos aromáticos clorados (Ngyen y Nobel, 1987) y totalmente impermeables al agua y otros compuestos iónicos polares características por las cuales, se han utilizado ampliamente para separar los contaminantes orgánicos por extracción en estuarios (Livingston, 1996; Prasard y Sirkar, 1988, Yun, 1992).

Los trabajos del equipo de Livingston (1993), han demostrado la eficacia de las membranas de silicona para la degradación de compuestos organoclorados, nitrobenenos y cloro nitrobenenos por las características intrínsecas del tipo de material que constituye la membrana.

Una característica importante de las membranas de silicona es que no existe choque de carga de flujo o materiales inorgánicos entre las dos fases y la transferencia del contaminante a través de la membrana se mantiene por la diferencia de concentración inducida por la mineralización biológica (Livingston, 1993; Brookes y Livingston, 1994). La adhesión de los microorganismos a la membrana de silicona ocurre espontáneamente debido a que las células microbianas son ligeramente hidrofóbicas al igual que la silicona (Freitas y Livingston, 1995).

Además de las membranas de silicona, existen otras fabricadas de polímeros organofílicos como las membranas asimétricas de ultrafiltración Zirfon® disponibles para su empleo en este tipo de problemas, ya que son membranas delgadas (de 10-50 nm con diámetro de poro promedio de 100 nm en la parte inferior y la parte abierta de 20-30 µm con un diámetro promedio de cerca de 1 µm) constituidas de materiales organo-minerales, con una matriz hidrofóbica de polisulfonato con cantidades variables de ZrO₂ como filtro inorgánico lo que determina sus propiedades hidrofóbicas (Peys, 1996).

Las membranas de silicona juegan un importante papel en los reactores de biomembranas debido a que permiten el paso selectivo de las moléculas orgánicas de la luz del tubo hacia el exterior mientras mantienen separadas las condiciones inorgánicas en el exterior de la membrana (Pavasant et. al., 1996). El transporte másico a través de la membrana se realiza por un mecanismo de difusión del contaminante hacia la biopelícula donde tiene lugar la degradación (Peys, 1996).

Ahora bien, para delimitar los procesos de transporte y separación en la membrana, se considera que solo tienen importancia aquellas fuerzas que dan lugar a flujos significativos de materia y por ello, se dice que una diferencia de presión entre dos fases, da lugar a un flujo de volumen, y un gradiente de concentración a través de la membrana provoca un flujo de masa. (Eguía, 1991).

12.6. MODELACIÓN MATEMÁTICA DE LA BIOPELÍCULA

El transporte de BPCs a través de la membrana se puede describir con un modelo de difusión de soluciones en el cual, la adsorción del contaminante en el interior del tubo de membrana se difunde a través de ella con la correspondiente desorción en el lado exterior del medio acuoso y está influenciado a su vez, por la permeabilidad de las fases donde las fuerzas de difusión a través de la membrana están dadas por la diferencia de potencial químico entre ellas (Stürken et. al., 1991).

Aunque existen varios modelos de biopelícula desarrollados para el tratamiento de aguas residuales utilizando biomembranas (Benefield, 1985; Park, 1984; Sáez y Rittmann, 1988; Skowlund, 1990; Wanner, 1986), el modelo propuesto por Pavasant et. al. (1996 y 1997) es al parecer el que más consideraciones posee para describir el conjunto de fenómenos que suceden dentro de un reactor de biomembranas, debido a que toma en cuenta, las coordenadas cilíndricas del reactor y es capaz de manejar diferentes variables simultáneamente como por ejemplo, el espesor de la biopelícula, concentración del contaminante, biomasa en suspensión y la tasa de producción de dióxido de carbono. Las suposiciones del modelo, toman en cuenta además las limitaciones de difusión del contaminante hidrófobo por un gran espesor de la biopelícula.

I.- El modelo asume, que la biomasa se desarrolla siguiendo la cinética de Monod (μ_x) en la transferencia de oxígeno y concentración del sustrato [contaminante]. Los parámetros cinéticos de las células inmovilizadas en la biopelícula se consideran idénticas a las células que se encuentran en suspensión. El mantenimiento y muerte celular se describen utilizando los mismos conceptos del coeficiente de degradación endógena (μ_e).

La tasa específica de reacción del contaminante, oxígeno y dióxido de carbono se pueden describir como una función de μ_x y μ_e con su correspondiente coeficiente de rendimiento.

$$(1) \quad \mu_s = - \left(\frac{\mu_x}{Y_{x_s}} \right)$$

$$(2) \quad \mu_s = - \left(\frac{\mu_x}{Y_{xO}} + \mu_a Y_{O_x}^e \right)$$

$$(3) \quad \mu_c = \left(\frac{\mu_x}{Y_{x_c}} + \mu_a Y_{O_x}^e \right)$$

II.- La tasa de desprendimiento de la biopelícula (r_d) depende de la concentración de sólidos (rbf), espesor (δ) y fuerza cortante (hidrodinámica) (γ) siguiendo el modelo propuesto por Rittmann (1982).

$$(4) \quad r_d = k_d \rho_{bf} (R_{in} \delta) \gamma^{0.58}$$

La tasa de adherencia (r_a) de la biomasa suspendida a la biopelícula se considera de primer orden y está en función de la concentración de la biomasa suspendida ($P_{x,sh}$).

$$(5) \quad r_a = k_d P_{x,sh}$$

Por lo tanto la tasa de eliminación neta (r_{net}) de la biopelícula esta dada por:

$$(6) \quad \Gamma_{net} = r_d - r_a$$

III.- El reactor de biomembrana considera el volumen de recirculación en el interior de los tubos de silicona para asegurar una concentración constante del contaminante a degradar.

IV.- El transporte de masas del contaminante, oxígeno y dióxido de carbono en la biopelícula están descritos por la ley de Fick.

V.- El medio mineral en el reactor debe estar completamente mezclado por una bomba de recirculación.

VI.- La concentración de sólidos de la biopelícula, los coeficientes de difusión y transferencia de masas del contaminante, oxígeno y dióxido de carbono deben ser constantes durante el tiempo de operación.

VII.- La biopelícula es homogénea y posee una superficie suave.

Por lo tanto el modelo de ecuación para el contaminante, oxígeno y dióxido de carbono en la biopelícula esta dado por:

$$(7) \quad \frac{\partial P_{s,bf}}{\partial t} = \frac{\vartheta_s}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial P_{s,bf}}{\partial r} \right) + \mu_{s,bf} \rho_{bf} \quad \text{para la reacción del contaminante}$$

$$(8) \quad \frac{\partial P_{o,bf}}{\partial t} = \frac{\vartheta_o}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial P_{o,bf}}{\partial r} \right) + \mu_{o,bf} \rho_{bf} \quad \text{para la reacción de } O_2 \text{ disuelto}$$

$$(9) \quad \frac{\partial P_{c,bf}}{\partial t} = \frac{g_c}{r} \frac{\partial}{\partial r} r \frac{\partial P_{c,bf}}{\partial r} + \mu_{c,bf} \rho_{bf} \quad \text{para la reacción de CO}_2$$

Sujetas a las siguientes condiciones de contorno:

$$(10) \quad g_s \frac{\partial P_{s,bf}}{\partial r} \Big|_{R_{in}} = -k_{R_{in},s} (P_{s,t} - P_{s,bf} \Big|_{R_{in}})$$

$$(11) \quad g_o \frac{\partial P_{o,bf}}{\partial r} \Big|_{R_{in}} = 0$$

$$(12) \quad g_c \frac{\partial P_{c,bf}}{\partial r} \Big|_{R_{in}} = 0$$

$$(13) \quad g_s \frac{\partial P_{s,bf}}{\partial r} \Big|_{R_{out}} = k_{R_{out},s} (P_{s,sh} - P_{s,bf} \Big|_{R_{out}})$$

$$(14) \quad g_o \frac{\partial P_{o,bf}}{\partial r} \Big|_{R_{out}} = k_{R_{out},o} (P_{o,sh} - P_{o,bf} \Big|_{R_{out}})$$

$$(15) \quad g_c \frac{\partial P_{c,bf}}{\partial r} \Big|_{R_{out}} = k_{R_{out},c} (P_{c,sh} - P_{c,bf} \Big|_{R_{out}})$$

La tasa de cambio del espesor de la biopelícula está en función de la tasa de desarrollo total y de la tasa de eliminación de la biopelícula.

$$(16) \quad \frac{dV_{bf} \rho_{bf}}{dt} = \int_{R_{in}}^{R_{out}} \mu_{x,bf} \rho_{bf} (2\pi r L) dr - \Gamma_{net} 2\pi R_{out} L$$

El modelo dinámico involucra el crecimiento de la biopelícula permitiendo la interfase no estacionaria biopelícula-medio mineral en el cual tiene lugar la transferencia de oxígeno y el contaminante. Esto forma un problema de movimiento de límites que puede ser resuelto por el método de Crank (1984) para transformar las ecuaciones a un sistema estacionario de límites que se resuelve a su vez por el método de diferenciales finitas mediante una computadora bajo el programa *Process Modelling System (GPROMS por sus siglas en inglés)* versión 1.4c desarrollado por *Center Process Systems Engineering del Imperial College UK*. (Pavasant, 1996; Freitas dos Santos, 1997).

12.7. FENÓMENOS IMPORTANTES EN LA BIOPELÍCULA

Por otra parte, en los reactores de biomembrana es importante considerar varios fenómenos durante el proceso de transporte de masas entre los que destacan:

- *El flujo en el seno del líquido.*- tanto los micronutrientes como el oxígeno entran al reactor disueltos en el medio líquido hasta llegar a la biopelícula y el flujo de ambos hasta la capa líquida estancada se da por difusión turbulenta y advección ya que existe agitación en el seno del líquido.
- *Flujo en la capa límite estancada.*- de acuerdo con esto, en la superficie de contacto del líquido con la biopelícula existe una capa líquida estancada en la cual, el transporte de micronutrientes y oxígeno sólo pueden darse por difusión molecular de baja magnitud, independientemente de la hidrodinámica del flujo en el seno del fluido.
- *Flujo dentro de la biopelícula.*- generalmente se considera, que el líquido que ocupa los espacios de la biopelícula no tiene movimiento, es decir se halla estancado; de tal manera que sólo es viable el flujo de masas por difusión molecular y según Characklis (1990) en la capa superficial predomina la advección (Osa, 1995).

La transferencia por difusión molecular en la capa límite estancada y a través de la biopelícula, limitan el flujo de masas de los micronutrientes y oxígeno. Si se analizan las concentraciones de los micronutrientes y oxígeno realizados en un perfil desde el seno del líquido hasta el soporte, se observa que ambas concentraciones disminuyen debido a la resistencia al flujo en la capa límite y en el interior de la biopelícula debido a la resistencia al flujo (Osa, 1995).

Ahora bien, en el diseño del reactor es importante conocer ciertas consideraciones y fenómenos que suceden en las membranas tales como:

12.7.1 AREA INTERFACIAL

Es el área de intercambio entre las fases a través de la membrana, la cual puede ser: área interfacial específica o el área por unidad de equipo (a^*). Este parámetro es difícil de determinar, ya que no sólo depende de la geometría de contacto, sino de las propiedades físicas de las fases y de la hidrodinámica de flujo, de tal manera que en una membrana el espesor de la pared (relleno) para contacto gas-líquido, el área interfacial depende de manera importante de la velocidad del líquido y del material que conforma el relleno; mientras que, un sistema líquido-líquido depende de la fracción de volumen ocupada por la fase dispersa y del diámetro de la gota, todo ello hace que normalmente se utilice como parámetro de comparación el área geométrica de la superficie de relleno por unidad de volumen de equipo (a).

En los reactores de membranas de silicona, el volumen de relleno constituye el volumen ocupado por los tubos, dado que la interfase puede inmovilizarse tanto sobre la superficie externa como en la interna; "a" puede referirse tanto al diámetro externo del tubo (d_e) como al interno (d_i) para reactores cilíndricos, como diámetros internos de carcasa (d_s), las áreas geométricas específicas externa e interna se expresan como:

$$a_e = 4 \cdot \phi / d_e \quad (12.9)$$

$$a_t = 4 \cdot \phi \cdot d_t / d_e^2 \quad (12.10)$$

Donde: ϕ es la fracción de empaquetamiento de los tubos en el reactor, y esta dada por:

$$\phi = N \cdot d_e^2 / d_s^2 \quad \text{donde "N" es el número de fibras} \quad (12.11)$$

Por lo tanto $(1 - \phi)$, representa la porosidad media del lecho formado por el haz de tubos, respecto al volumen vacío o total del reactor.

Si se supone que la interfase está inmovilizada en la boca de los poros, el área interfacial y el área geométrica deben de estar relacionadas a través de la fracción de huecos en la superficie de la membrana (ξ):

$$a^* = \xi \cdot A \quad (12.12)$$

Y se puede tener una expresión aproximada, considerando esta fracción igual a la porosidad volumétrica del tubo (ε), con lo que se tendría entonces:

$$a^* = \varepsilon \cdot a \quad (12.13)$$

Por lo tanto, en los reactores de membrana de alta porosidad, el área interfacial efectiva puede estar bastante aproximada al área geométrica, lo que no ocurre en los rellenos convencionales, donde puede llegar a ser notablemente inferior (Osa, 1995).

12.7.2. HIDROFOBICIDAD

La hidrofobicidad de una membrana está dada por su capacidad para evitar la permeabilidad del agua. Esta propiedad depende del número y polaridad de los grupos funcionales contenidos en la estructura química del polímero. Así, los polímeros celulósicos o hidroxílicos, que contienen gran número de grupos OH son altamente polares y transportan con facilidad el agua. Por el contrario, los polímeros hidrocarbonados muy poco polares, tales como el polipropileno constituyen excelentes barreras para el agua e impiden que ésta moje su superficie (hidrófobos) (Osa, 1995).

12.7.3. PRESIÓN DE BURBUJA Y PRESIÓN DE MOJADO

Estos parámetros limitan las presiones de operación necesarias para mantener inmovilizada la interface y evitar la dispersión de una fase en otra.

La presión de burbuja, "Pb", se define como la presión de gas necesario para desplazar un líquido de los poros y está relacionada con el diámetro del poro " d_p " y la tensión superficial del líquido σ , de acuerdo a la siguiente expresión:

$$P_b = 4 \cdot \sigma / d_p \quad (12.14)$$

En sistemas líquido-líquido, donde el carácter hidrófobo o hidrófilo de la membrana determina la fase que llena los poros, el parámetro equivalente es la presión de mojado, que se define como la mínima presión de líquido externo, necesaria para desplazar el líquido que llena los poros y se expresa por:

$$P_m = 4 \cdot \cos \varphi / d_p \quad \text{Donde: } \varphi \text{ es el ángulo de contacto} \quad (12.15)$$

12.7.4. HIDRODINÁMICA

Entender las interrelaciones entre hidrodinámica y transporte de soluto es esencial para modelizar el proceso de acumulación de la biopelícula con los cuales se puede predecir la eficiencia de biodegradación en el reactor.

En el análisis del funcionamiento hidrodinámico de reactores de biomembrana, los conceptos de flujo turbulento y flujo laminar son fundamentales. En el flujo laminar, las fuerzas inerciales del fluido son insuficientes para vencer las fuerzas viscosas del mismo, lo que da por resultado el movimiento estable del fluido establecido por capas o láminas que no se mezclan totalmente; por el contrario, en un flujo turbulento, se desarrollan corrientes turbulentas dando por resultado la mezcla completa del fluido a lo largo de la trayectoria del flujo (Cunningham, 1989 citado por Valenzuela, 1993).

Un flujo se puede clasificar como laminar o turbulento de acuerdo a una magnitud adimensional conocida como *Número de Reynolds (Re)* definido como.

$$Re = \frac{V \cdot L}{\nu} \quad \text{Donde:} \quad (12.16)$$

V = Velocidad del flujo (L/T)
 L = Longitud característica
 ν = Viscosidad cinemática

Para flujos a través de medios porosos, L es generalmente el diámetro medio; conceptualmente Re representa la razón entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas y para ello, se define un valor por debajo del cual el flujo es laminar y por encima del cual comienza a ser turbulento; para medios porosos, este valor es 6.1

En sistemas porosos, se observan valores de Re dentro del rango laminar. Si $Re < 1$, entonces se presume válida la *ley de Darcy* que sirve como base para definir la relación entre la hidrodinámica y el medio poroso expresada por:

$$V = k \left(\frac{dh}{dL} \right) \quad (12.17)$$

Donde:

V = Velocidad específica (L/T), caudal entre superficie total

k = Permeabilidad hidráulica (L/T)

dh/dL = Gradiente de presión en dirección del flujo.

Las trayectorias que sigue el flujo a través del medio poroso, son muy tortuosas y variables resultando de esto, una amplia distribución de velocidades (dificiles de medir), que afectan significativamente la acumulación de la biopelícula dentro del medio poroso (Valenzuela, 1993).

12.7.5. FRICCIÓN

Las resistencias al paso del fluido, debido a la fricción de rozamiento es una medida de la transferencia de momento, desde el fluido a la superficie confinada, y se puede cuantificar mediante un coeficiente adimensional de fricción f , con la siguiente expresión:

$$f = \frac{\text{Fuerza de arrastre / área característica}}{\text{Energía cinética / volumen}} \quad (12.18)$$

Para el flujo en medio poroso, laminar o turbulento, f varía con el Re según la relación expresada por la *ecuación Carmen-Kozeny* donde α es la porosidad promedio del medio:

$$f = 150 \cdot \frac{1-\alpha}{Re} + 1,75 \quad (12.19)$$

La acumulación de biopelícula produce un incremento del factor de fricción. La acumulación influye también sobre la hidrodinámica del flujo a través del medio poroso. Sin embargo, este efecto se debe básicamente a la disminución del diámetro efectivo del poro, el cual se ve disminuido por la biopelícula y por consecuencia disminuye la permeabilidad (Cunningham, 1989 citado por Valenzuela, 1993).

Recientemente, las tecnologías de separación de contaminantes a través de biomembranas ha encontrado gran variedad de aplicaciones en el tratamiento de residuos industriales peligrosos, los cuales se pueden remover en la fuente de generación con mayores ventajas que las tecnologías convencionales (Stürken et. al., 1991); las innovaciones más recientes realizadas por el equipo de investigación de Livingston (1993) han demostrado la eficiente biodegradación de varios tipos de compuestos organoclorados utilizando sistemas de biopelícula adheridas a membranas; siendo los compuestos aromáticos clorados los que muestran mayores eficiencias de eliminación en éste tipo de biorreactores.

Entre los procesos biológicos utilizados recientemente, los tratamientos con biomembranas son los menos sensibles a los cambios bruscos de concentración del contaminante ya que están caracterizados por una alta concentración de biomasa que es capaz de inmovilizar los compuestos por adsorción, fenómeno que juega un papel importante en la asimilación del compuesto. Además, el uso de los reactores de biomembranas difiere de los sistemas de tratamiento biológico convencionales por las siguientes características:

- ♦ Estabilidad del proceso.- Se mantiene la reducción del contaminante eficazmente aun en

- condiciones ambientales variables como por ejemplo paradas y arranques del reactor.
- ◆ Posibilidad de operar a altas concentraciones del contaminante ya que éste no se encuentra en contacto directamente con la biomasa y es proporcionado de manera "dosificada" por la lenta difusión a través de los poros de la membrana.
 - ◆ Reducción de los requerimientos operacionales.- ya que se reduce el mantenimiento por la poca generación de fangos.
 - ◆ Son de diseños sencillos y utilizan generalmente menores consumos de energía que los sistemas convencionales, además de ser modulares y de fácil operación.
 - ◆ Tienen costos de implementación mucho menores que los reactores convencionales.
 - ◆ Poseen un gran potencial de mineralización de contaminantes aromáticos clorados a bajo costo, si se compara con los sistemas de oxidación química e incineración.
 - ◆ No genera subproductos tóxicos al medio ambiente.
 - ◆ Las altas concentraciones de biomasa pueden traer consigo problemas con la transferencia de sustratos y oxígeno dentro de la membrana.
 - ◆ La producción de energía se lleva a cabo por la gran actividad y concentración de la biomasa y a los procesos biológicos de las reacciones exotérmicas (oxidación, nitrificación y desnitrificación).
 - ◆ En los requerimientos de oxígeno del reactor, alta concentración de biomasa produce una gran demanda de oxígeno debido a los procesos de oxidación.
 - ◆ La producción de lodos en los reactores de biomembrana es mucho menor que en los sistemas convencionales.
 - ◆ Las necesidades de oxígeno se pueden suministrar utilizando sistemas de burbujeo de oxígeno, ya que las membranas de silicona son permeables al oxígeno además de ser muy resistentes a la abrasión química y mecánica (Cote, 1988).
 - ◆ Los requerimientos de energía para mantener la actividad biológica pueden verse incrementados manteniendo una velocidad de recirculación adecuada para permitir el paso del contaminante a través de la membrana.

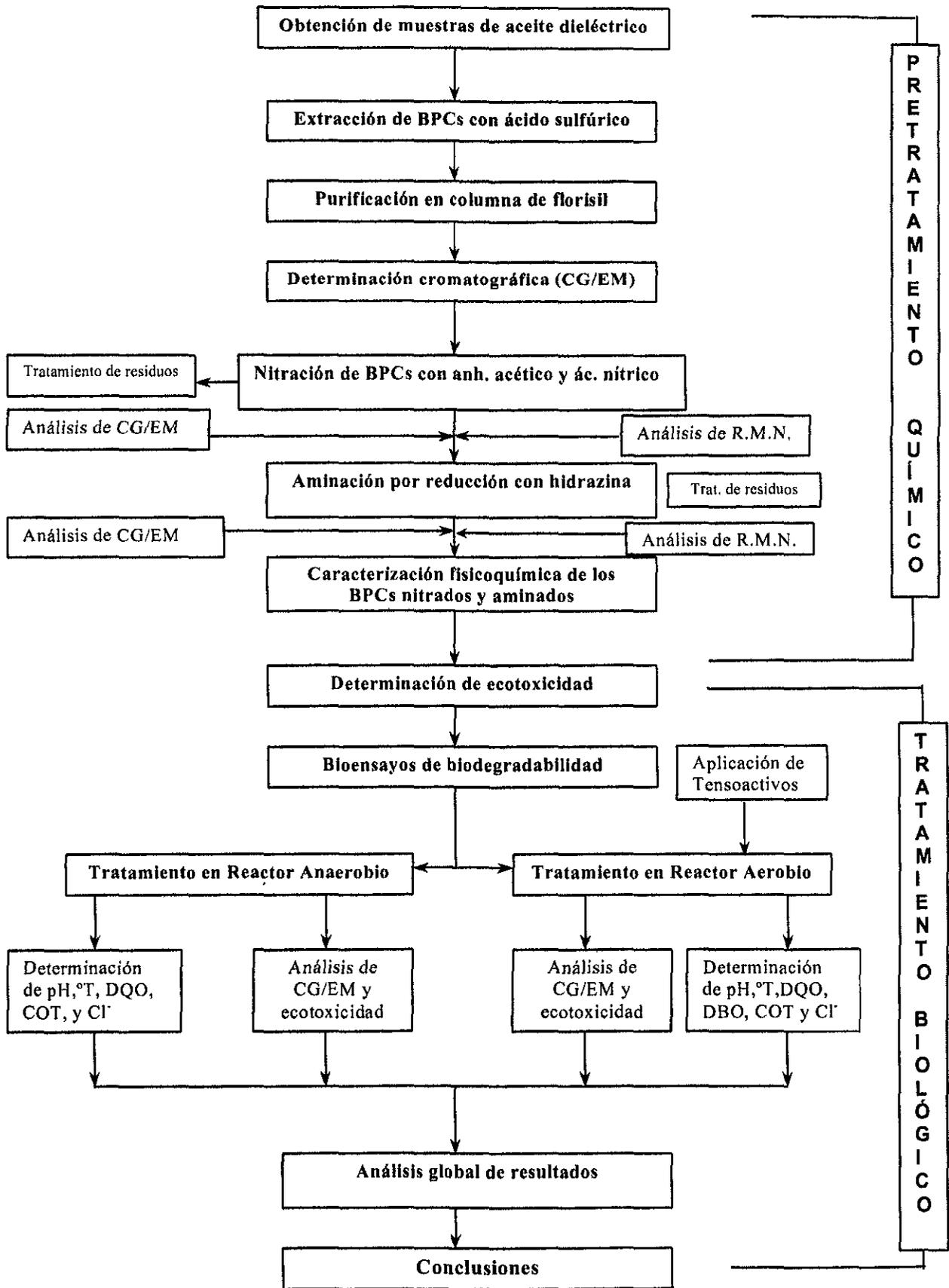
Capítulo XIII.

METODOLOGÍA

13. METODOLOGÍA

El presente estudio, se realizó en el seno de un grupo investigadores especialistas en cromatografía de gases/masas y resonancia magnética nuclear del Instituto de Química y el Posgrado de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, interesados en la biodegradación de residuos industriales tóxicos y peligrosos en combinación con un grupo de trabajo con amplia experiencia en diseño y operación de reactores de biomembrana en el Departamento de Ciencias y Técnicas del Agua y Medio Ambiente de la Universidad de Cantabria, (España). Aprovechando pues, la amplia experiencia y posibilidades de desarrollo de las técnicas en las áreas mencionadas, se planteó un estudio de eliminación de BPCs aplicando previamente un tratamiento químico de nitración y posterior reducción a amina que incluyera de modo amplio, aspectos cualitativos, cuantitativos y de biodegradación de BPCs cuyos beneficios fuesen tanto de aplicación teórica como de utilidad práctica.

13.1. El trabajo experimental comprendió las etapas que se presentan en el diagrama XIII-1



13.2. Obtención de muestras de aceites dieléctricos

Las muestras de aceites dieléctricos con BPCs fueron obtenidas en los centros de almacenamiento de transformadores eléctricos en la Comisión Federal de Electricidad de México, Sistema de Transporte Colectivo Metro de la ciudad de México y de la compañía Hidronor S.A en Bilbao (España). Los estándares comerciales de BPCs de las familias Aroclors[®] 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260 fueron adquiridas en la Casa Comercial Supelco.

13.3. Determinación de la concentración de BPCs en las muestras de aceites dieléctricos

La determinación de la concentración de BPCs en las muestras de aceites dieléctricos fue realizada por diferencia de peso antes y después de la extracción con ácido sulfúrico la cual se describe a continuación.

13.3.1. Técnica de Extracción de BPCs

Se realizó la extracción de BPCs de las muestras de aceite dieléctrico por medio de la técnica del ácido sulfúrico con el objeto de eliminar todas las interferencias orgánicas; para ello:

- ◆ Se agregan 10 ml de la muestra de aceite dieléctrico en un embudo de decantación, añadiendo 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y 25 ml de agua; se agita ligeramente con precaución, ya que la reacción es muy violenta y se generan gases. Se repite el proceso cinco veces o hasta que en la fase orgánica se observe una solución transparente.
- ◆ Se separan las fases acuosa y orgánica por decantación; en caso de formarse una emulsión, se añaden 10 ml de metanol para separar las fases y 10 ml de hexano para recuperar el BPC.
- ◆ Se extrae la fase orgánica disuelta en hexano en un vaso de precipitado; en caso de quedar residuos de la fase acuosa se añade metanol y hexano y se vuelve a decantar en otro vaso de precipitado.
- ◆ Se evapora el hexano en rotavapor y se recupera el BPCs.

13.3.2. Técnica de Purificación

Se realizó la purificación de BPCs en una columna cromatográfica de florisil[®] con el objetivo de eliminar cualquier interferencia de compuestos organoclorados, para ello:

- ◆ Se activa el florisil en una estufa a 130 °C durante 24 horas.

- ◆ Se prepara la columna cromatográfica empacando la columna con 1 cm de fibra de vidrio añadiendo aproximadamente 20 cm de florisil activado con ligeros movimientos rotativos para lograr la homogeneización del empacado y finalmente se adiciona una última capa de 1 cm de sulfato de sodio anhidro.
- ◆ Una vez preparada la columna se realiza una primera elución añadiendo hexano hasta cubrir toda la columna más 1 cm; se añade el BPC hasta 1 cm por encima del sulfato añadiendo más hexano hasta completar 80 - 100 ml.
- ◆ Se recupera el BPCs purificado en un vaso de precipitado evaporando el hexano para concentrar la mezcla de BPCs.
- ◆ Se debe lavar la columna de florisil con 100 ml de acetona y hexano manteniendo llena siempre la columna; una vez lavada la columna se puede utilizar para seguir purificando más BPCs.

13.4. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE BPCs

La caracterización analítica de BPCs se realizó por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG/EM).

- El equipo de utilizado fue un Cromatografo Hewlett Packard Serie II acoplado a un Espectrómetro de masas Jeol JMS-AX505HA. El equipo utiliza una columna ultra-2 de fenil-silicona de 25m X 0.2mm IDX 0.33 μ m fue proporcionado por el Instituto de Química de la UNAM para el análisis de la muestras obtenidas en México y un equipo de CGg/EM Perkin Elmer modelo *Q-mass* 910 serie 8000 con AutoSystem controlado por computadora. El cromatógrafo utiliza una columna OV1 (100% metil silicona) de 25 m X 0.25mm ID X 30 X 25 μ m. El equipo de CG/EM fue proporcionado por el Centro Investigación de Medio Ambiente (C.I.M.A.) de Cantabria, España.

13.4.1. Condiciones Operativas del Cromatógrafo de Gases para el Análisis de BPCs

Horno	
Gas portador He/presión	45 Kpa
Temperatura de inyección	250 ° C
Detector de temperatura	290 ° C
Temperatura inicial	70 ° C mantener por 2 min.
Programa de temperatura	70 ° C hasta 285 ° C a 4 °C/min
Temperatura final	285 ° C mantener por 10 min.
Inyección	1,0 μ
Condiciones del espectrómetro de masas	
Temp. Fuente de ionización	250 ° C
Energía de electrón	70 eV
Barridos de masa	50-500 Da,
Tiempo de barrido	1 seg/ década
Detector	250 V

Para la preparación de muestras de BPCs para su determinación analítica se disolvió el extracto seco de cada uno de los compuestos en 2 ml de hexano para el análisis cromatográfico

correspondiente, se tomó 1.0 µl de muestra y se procedió al análisis por inyección al cromatógrafo con "splitless" abierto; se realizaron al menos 3 inyecciones del concentrado.

13.4.2. Soluciones patrón

Los patrones de Aroclor® comerciales pueden variar en su composición lo que supone una importante fuente de errores en el proceso de cuantificación cuando se utilizan como patrones; para evitar esto, la Comunidad Económica Europea aconseja la determinación utilizando una serie de isómeros individuales seleccionados por su facilidad de ser detectados en la mayoría de las mezclas comerciales y ambientales. Por otra parte, con la cuantificación de picos aislados, se elimina el factor subjetivo de seleccionar el perfil de un tipo especial de Aroclor® y se asemeja más a los componentes existentes en la muestra.

Los Isómeros de cuantificación utilizados como patrón corresponden a los números 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180 de la IUPAC.

En principio, se ha seleccionado un isómero por cada tipo de congénere (tetra, penta, hexa, y heptaclorobifenilo) del patrón y se realizó la curva de calibrado para cada uno de ellos preparando distintas concentraciones y representando el área obtenida frente a la concentración. Las concentraciones utilizadas y las áreas obtenidas se presentan en las figuras 1,2,3 y 4 como se puede observar, los puntos se ajustan bien a una ecuación del tipo ($y = ax + b$) por lo que se han utilizado para la cuantificación de los BPCs.

Para la cuantificación, se introduce la muestra problema al cromatógrafo y se calcula el área dependiendo del tipo de congénere (tetra, penta, hexa, o heptaclorobifenilo) aplicando la ecuación obtenida anteriormente para cada patrón. Fue necesario diluir 100 veces en hexano la muestra concentrada de BPC para no saturar el detector del espectrómetro por lo que los valores obtenidos fueron multiplicados por 100.

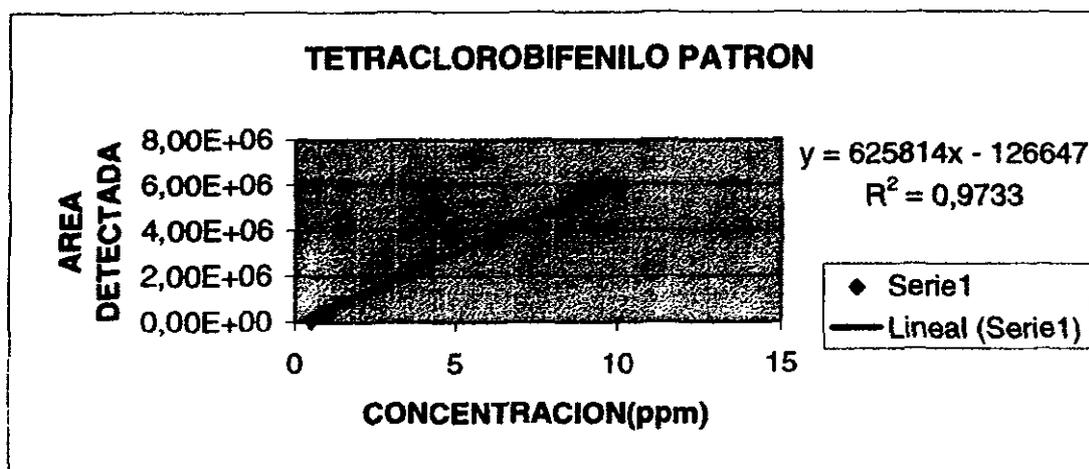
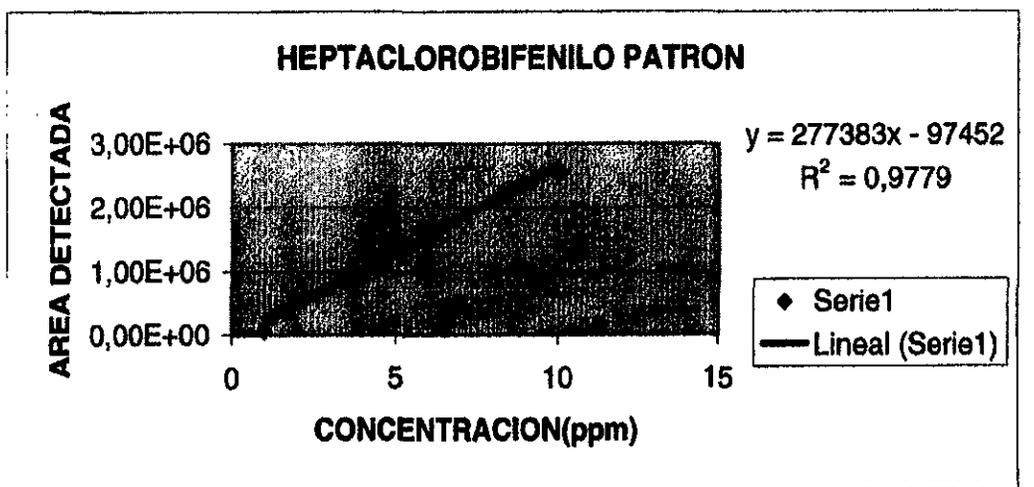
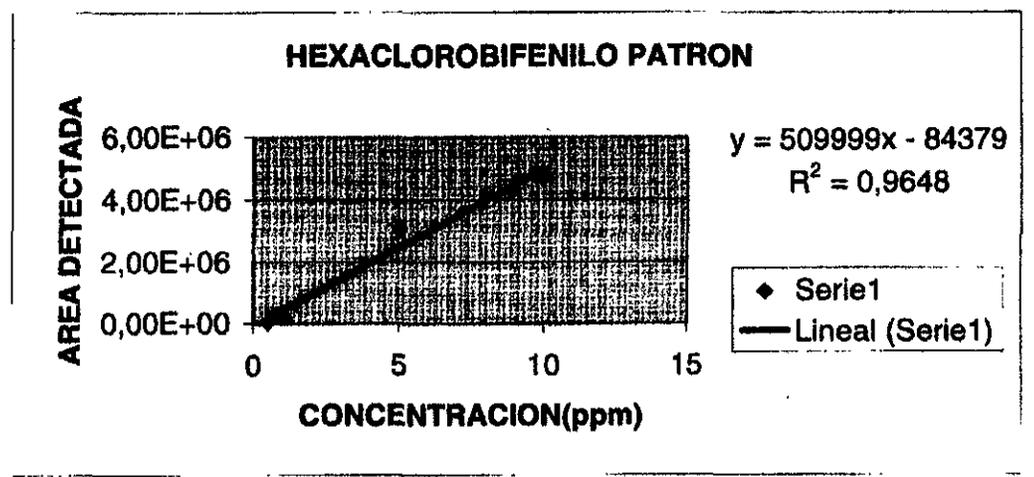
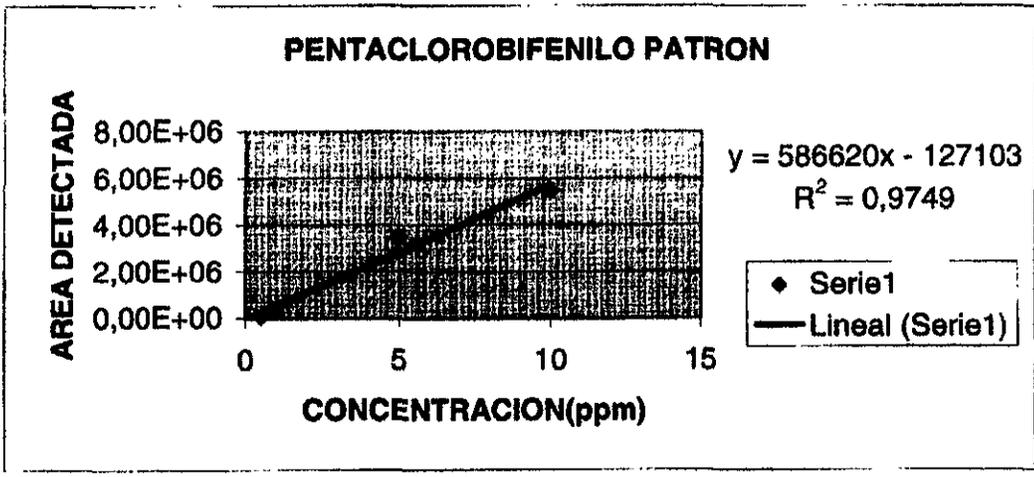


Figura No.XIII-1.- Recta de calibrado del patrón tetraclorobifenilo.



Figuras No.XIII-2,3 y 4 Rectas de calibración de cada congénere utilizado como patrón.

Es importante aclarar que todos los isómeros están referidos a mismo patrón por ejemplo, todos los hexaclorobifenilos están referidos al mismo hexaclorobifenilo ya que no se disponía de todos los isómeros hexaclorobifenilos para distinguirlos entre ellos; en realidad es una determinación semicuantitativa ya que todos los hexaclorados no responden de igual forma al espectrómetro de masas; incluso en algunos casos, ciertos hepta y octacloro bifenilos eluyen juntos y no es posible cuantificarlos.

Con respecto a la cuantificación de los octaclorobifenilos, no ha sido posible realizar la recta de calibración ya que se requería de una concentración mayor a 10 ppm de la que existe en la disolución patrón y debido además, a que por debajo de esta concentración, la respuesta de este tipo de congénere es apenas perceptible por el detector de masas.

13.4.3. Requerimientos Instrumentales

Cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (CG/EM).
Columna capilar OV1 (25mX 0,25mm id, 30µm)
Material de cristal.

13.4.4. Reactivos Utilizados

Solventes orgánicos garantizados para plaguicidas.
Estándares de BPC (Aroclor[®] 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260).
Ácido sulfúrico concentrado
n-hexano
Florisil de 150 a 250 mm de Merck
Sulfato de sodio anhidro

13.5. PRETRATAMIENTO QUÍMICO

La idea de realizar el tratamiento de nitración y posterior reducción a amina a la molécula de BPC con el objetivo de modificar sus principales propiedades que inhiben su biodegradación surgió del grupo de investigadores mexicanos de la Universidad Regiomontana, Instituto de Química y División de Estudios de postgrado de la Facultad de Ingeniería, Sección Ingeniería Ambiental de la UNAM.

13.5.1. Procedimiento de Nitración

Para la nitración de los patrones de BPCs se utilizó la técnica modificada de Chaudhary y Albro (1978) mezclando 2.2 ml. (0.02 mol) de anhídrido acético a 0 °C con ácido nítrico fumante (1,6 ml, 0.04 moles), enfriado a la misma temperatura, y a esta mezcla se le añadieron 50 mg de cada uno de los estándares de los Aroclors.[®]

Para la nitración de los BPCs extraídos de los aceites dieléctricos, se utilizaron 6.44 ml de anhídrido acético y 4.68 ml de ácido nítrico fumante por cada 10 ml de BPC.

- La temperatura de reacción de la mezcla aumenta a 50 °C después de dos horas de agitación mecánica a temperatura ambiente, y se debe mantener durante 30 minutos más en baño María.
- Se lava la mezcla sulfonítrica con agua fría varias veces para eliminar todo el residuo ácido; la fracción sólida formada, se filtra sobre filtro de vidrio y se lava con 50 ml de bicarbonato de sodio al 10% y agua destilada, se añade hexano y se realiza la separación y aislamiento de los BPCs nitrados de la mezcla por decantación recuperando la fase orgánica en un embudo de separación.
- Es conveniente realizar una purificación en columna cromatográfica de florisil recuperando el BPC nitrado por evaporación del hexano y secándolos con lámpara de luz infrarroja.
- El producto generado de este tratamiento se utiliza para realizar el proceso de aminación por reducción con hidrazina.
- Se realizó además el análisis cromatográfico correspondiente y el estudio de las posiciones nitradas por medio del análisis resonancia magnética nuclear.

13.5.2. Técnica de Reducción con Hidrazina

Para la aminación del producto de tratamiento de nitración, se aplicó la técnica modificada de reducción catalítica con cloruro férrico e hidrazina propuesta por Hirashima y Manabe (1975) por ser una técnica relativamente rápida y libre de interferencias en los resultados; para ello:

- Se diluyen 10 ml de BPCs nitrados en 20 ml de metanol dentro de un matraz.
- Se añaden 25 ml de hidrazina al 80 %.
- Se añaden 5 gotas de cloruro férrico al 10 % como catalizador.
- Se agita suavemente (con agitador magnético) durante 15 min.
- Se separa el residuo de hierro por decantación.
- Se añade una pequeña cantidad de hexano para separar las fases acuosa y orgánica formadas y recuperar la fase orgánica.
- Se realiza una purificación en columna con florisil.
 - Se realizan los estudios de CG/MS y MNR- H^1 correspondientes.
 - Se aplica el BPC aminado en el tratamiento de biodegradación en el reactor aerobio.

13.5.3. Reactivos

- Solventes orgánicos garantizados para plaguicidas
- Anhídrido acético

- Acido nítrico fumante
- Soluciones estándares de Aroclor[®] 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260 de 50 mg cada uno
- *n*-Hexano

13.5.4. Materiales y Equipo

- Matraces y tubo de vidrio para el proceso de nitración de BPCs
- Embudo separador de vidrio de borosilicato con tapa de vidrio esmerilado
- Placas de agitación magnética
- Equipo de baño María
- Lana de vidrio

13.6. Manejo de Residuos

El tratamiento de los residuos generados de los tratamientos químicos se realizó por recuperación de reactivos a partir de la mezcla sulfonítrica e hidrazina por destilación fraccionada y posterior reutilización en un lecho de hidróxido de sodio para neutralizar el pH.

13.7. PREDICCIÓN DE POSICIONES NITRADAS

Debido a la falta de información y referencias bibliográficas de bifenilos policlorados nitrados y aminados fue necesario realizar un programa de predicción de las posibles posiciones de nitración y aminación de las mezclas comerciales de Aroclors[®].

13.7.1 Tratamiento Matemático en el Programa MatLab

La predicción de las posiciones nitradas se realizó mediante un tratamiento matemático con el programa Matlab versión 5.0 de la compañía Mathwork; para esto fue necesario crear una matriz cuyas dimensiones fueron 10 x 210 celdas, en las cuales cada columna corresponde a uno de los 209 isómeros, según la nomenclatura IUPAC, más el 210 que corresponde al bifenilo no clorado; las filas corresponden a la posición del grupo nitro introducido en cualesquiera de las posiciones *orto*, *para* o *meta*.

Los valores determinados en la matriz son: 0 = posición del hidrógeno, 1 = posición clorada y 2 = posición nitrada. A partir de esta matriz, se define una función de nitración que actúa sobre cada isómero según las siguientes reglas:

- a) Para cada anillo, si la posición *para* no está sustituida se nitra.
- b) Si ésta se encuentra sustituida, se nitra en cualquier posición *orto* libre.
- c) Se puede nitrar en la posición *meta* sólo si es la única posición libre y
- d) No puede haber más de dos grupos nitro por cada anillo.

Para calcular las masas de los isómeros de BPCs y BPCs nitrados, se han tomado en cuenta los siguientes pesos moleculares: C = 12, H = 1, Cl = 35, N = 14, O = 16.

Para la rápida identificación cromatográfica de los productos nitrados se sumaron los pesos atómicos de los grupos nitro al ion de identificación del isómero de BPC.

Para confirmar la efectividad del proceso de nitración, se realizó la comparación de los valores de las masas de los compuestos obtenidas por medio del análisis cromatográfico (realizando un monitoreo selectivo de iones) y los análisis de resonancia magnética nuclear con las propuestas por el programa MatLab.

13.8. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE BPCs NITRADOS Y AMINADOS

La identificación de los componentes de los BPCs nitrados y aminados, se realizó también por espectrometría de masas con un programa cromatográfico de menor temperatura para obtener una mayor resolución y evitar la posible descomposición térmica de los grupos nitro y amino introducidos a la muestra. Se requirió además, de la aplicación de las técnicas de RMN- H^1 para la comprobación de las posiciones nitradas y aminadas en la estructura molecular de los diferentes congéneres de estos compuestos.

Para la identificación cromatográfica de los productos nitrados se calcularon los pesos moleculares considerando la posibilidad de hasta dos grupos nitro por molécula de BPC.

Condiciones operativas del cromatografo de gases masas para el analisis de BPCs nitrados y aminados:

Horno	
Gas portador	Helio a 30 cm/seg
Temperatura de inyección	250 ° C
Detector de temperatura	290 ° C
Temperatura inicial	40 ° C mantener por 4 min.
Programa de temperatura	40 ° C hasta 270 ° C a 10 °C/min.
Temperatura final	270 ° C mantener por 4 min.
Inyección	1.5 µl
Condiciones del espectrómetro de masas	
Temp. Fuente de ionización	250 ° C
Energía de electrón	70 eV
Barridos de masa	35-500 uma
Tiempo de barrido	1 seg/década
Detector	250 V

13.9. DETERMINACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Los análisis de Resonancia Magnética Nuclear de las muestra generadas en México y España fueron realizados por Chávez (1998) en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el objetivo de verificar las posiciones nitradas y aminadas en la molécula de BPC, utilizando un equipo de RMN marca Varian Gemini modelo 200

funcionando a temperatura ambiente de 20 °C, utilizando disolventes polideuterados y a una frecuencia de 200 MHz..

13.10. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS BPCs NITRADOS

13.10.1. ANALISIS CALORIMETRICO DIFERENCIAL

El análisis de calor y temperaturas de transición de los BPC nitrados, se realizó utilizando un equipo "Analizador Calorimétrico Diferencial" (Differential Scanning Calorimetry, DSC) con las siguientes condiciones de operación:

Celda del DSC: L=30 cm; A= 13 cm; H=19 cm
Rango de temperatura: -170°C hasta 725°C
Tamaño de muestra: 0.5 a 100 mg
Volumen de la muestra: 10 mm³ en cápsulas herméticas
Cápsulas abiertas y selladas
Volumen de la celda 2 cm³
Termopar de la muestra: Cromo-aluminio
Termopar de control: Platinel® II

Las muestras fueron analizadas en un rango de -150°C a 300°C mediante la técnica siguiente:

1. Pesar 10 mg de muestra en una cápsula de paladio.
2. Sellar la cápsula
3. Se introduce al equipo DSC.
4. Se baja la temperatura con nitrógeno líquido hasta -150 °C
5. Una vez alcanzada la temperatura de -150°C, se inicia la rampa de calentamiento (10°C/min) registrando los cambios de calor y temperatura que experimenta la muestra durante el proceso.

13.11. DETERMINACIÓN DE ECOTOXICIDAD

Antes de la aplicación del BPC aminado en el tratamiento biológico, se determinó su ecotoxicidad mediante el método de bioensayo de luminiscencia de la bacteria *Photobacterium phosphoreum*, en el cual se considera que una sustancia es ecotóxica si presenta una EC₅₀ (concentración efectiva de la sustancia que reduce la emisión de luz de las bacterias en un 50%) inferior o igual a 3.000 mg/l bajo las siguientes condiciones de ensayo: 15 °C durante 15 min aplicando 10 ml de muestra disuelta en agua utilizando un equipo Microtox 500 (Microbics, 1998). El ensayo fue realizado en el Departamento de Química de la Universidad de Cantabria.

13.12. APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

13.2.1. Descripción Técnica de la Experimentación

La investigación fue realizada primero con bioensayos y posteriormente en los reactores de biomembrana en fases aerobia y anaerobia con el mismo método experimental utilizando los bifenilos policlorados que han sido aminados en el pretratamiento químico anterior.

1. En una primera etapa, se realizaron 4 ensayos de degradación aerobia del BPC aminado mediante técnicas de bioensayo determinando también, los subproductos generados durante el proceso mediante análisis cromatográfico. Los resultados de esta fase, fueron utilizados para determinar los parámetros de control del reactor, tales como: el tipo y concentración del medio mineral a utilizar, control de pH, temperatura, rango de oxigenación del sistema y tipo concentración de metabolitos generados; así como la evacuación de subproductos tóxicos que pudiesen intervenir en el rendimiento total del sistema.
2. En una segunda etapa, se realizaron los tratamientos de biodegradación de los BPCs aminados en los reactores anaerobio y aerobio con el fin de determinar cómo influye el proceso de dechloración anaerobia y oxidación aerobia en el rendimiento del total del proceso de degradación del compuesto.
3. Tanto en los bioensayos como en los reactores, se utilizó un medio mineral con glucosa como cosustrato en la primera fase de adhesión de la biopelícula a la membrana y posteriormente sólo BPC aminado como única fuente de carbono.

13.12.2. Prueba de BPCs Aminados como Sustrato de Crecimiento

Se realizaron 4 bioensayos para determinar de forma rápida y económica la capacidad de degradación y actividad conjunta de las cepas de microorganismos sobre los BPCs aminados. Los ensayos aerobios, se realizaron en matraces provistos de una tubería para el suministro de oxígeno. La biomasa se adhiere a la parte externa de una membrana tubular de silicona con alimentación de BPCs aminados en la parte interna de la misma, de modo que se establece el flujo del contaminante a ser degradado por la difusión del compuesto a través de las fibras de la membrana permeable hacia la biopelícula. En todos los bioensayos se suministraron los micronutrientes necesarios.

- ◆ Para determinar la utilización de los BPCs aminados como sustrato de crecimiento por los microorganismos; se prepararon los matraces de 500 ml conteniendo el medio mineral con glucosa y amonio sólo al inicio del desarrollo de la biopelícula; posteriormente sólo se utilizó BPC aminado. Se añadió además, un buffer de fosfatos para mantener el pH en 7,2. El suministro de oxígeno fue realizado por burbujeo a temperaturas de incubación de 24°, 26° y 28 °C.
- ◆ Se realizaron cuatro bioensayos utilizando: a) en el primero, el hongo de la putrefacción blanca *Phanerochaete chrysosporium*, b) en el segundo una mezcla de hongos formada por *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Nocardia uniformis*, *Nuerospora crassa*, *Tricoderma ressei*

y *Phanerochaete chrysosporium*. c) en el tercer bioensayo se utilizó una mezcla de bacterias principalmente de los géneros *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Acinetobacter sp.* y d) en el cuarto bioensayo se utilizó una mezcla de todos estos microorganismos.

- ◆ La siembra se realizó por inoculación con asa bacteriológica de cada una de las cepas de microorganismos, en un matraz de 50 ml con medio mineral diariamente durante un lapso de 7 días durante el período de colonización y posteriormente cada 3 días.
- ◆ De los 50 ml inoculados con la cepas se tomaron 0.5 ml de la suspensión de microorganismos y se midió su absorbancia con un espectrofotómetro 20 a $\lambda = 660$ nm dando por resultado un valor de 1.0 Unidades de absorbancia. El crecimiento de los microorganismos fue registrado durante un período de 3 días, volviendo a medir la densidad óptica del medio a $\lambda = 615$ nm; una lectura superior de 0.3 unidades de absorbancia, fue considerada como prueba de crecimiento efectivo.
- ◆ En el matraz, se introdujeron los tubos de membrana de silicona en forma de "U" (figura XIII-5) para que sobre ellas se desarrollase la biopelícula en un período aproximado de una semana.

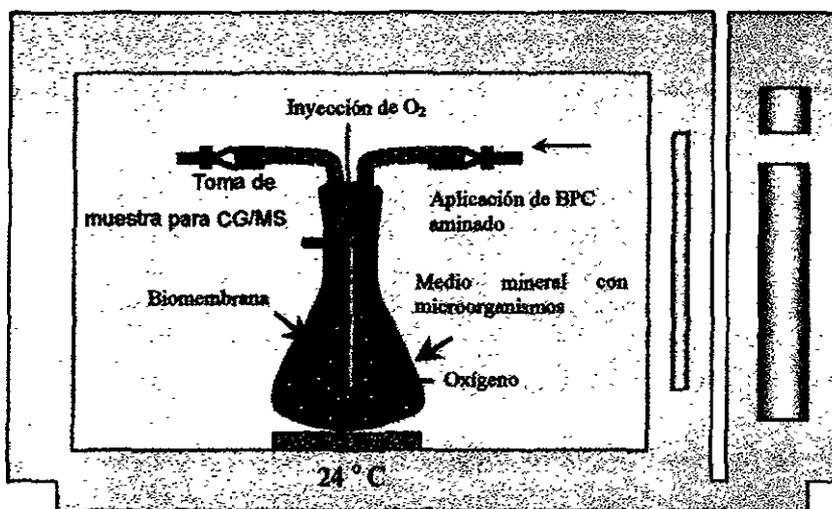


Fig. No.XIII-5.- Representación esquemática de las condiciones en que se realizaron los bioensayos

- ◆ Una vez desarrollada la biopelícula, se añadieron 10 ml de muestra de BPCs aminado en el interior del tubo, siendo biodegradado a medida que se difunde a través de las fibras de la membrana hacia la biopelícula. En este caso particular, no es necesario esperar un período de aclimatación de la biomasa al sustrato, ya que el contaminante se encuentra separado de la biomasa por la membrana de silicona. Ésta sirve como medio dosificador impidiendo concentraciones excesivas en la biopelícula.
- ◆ Pasado los períodos de toma de muestras, se determinó la acumulación de metabolitos formados por medio de CG/EM preparando alicuotas de 20 ml a partir del medio de cultivo, filtrando y sedimentando las células previamente por centrifugación.

- ◆ Se determinó la eliminación de los BPCs aminados en la biopelícula, por la medida de la absorbancia a 386 nm en el medio mineral y por determinación de la acumulación de metabolitos identificados por CG/EM.
- ◆ El porcentaje de la biodegradación de los BPCs aminados se determinó por CG/EM realizando los cálculos estequiométricos de las reacciones entre los productos y los metabolitos generados.

13.12.3. Determinaciones Analíticas

1. pH.- Se determinó aplicando el método electrométrico (4500-H⁺ B) del APHA (1992) con un equipo Crison, modelo 2001.
2. Oxígeno disuelto.- Se determinó empleando un equipo de medición de oxígeno marca Jenway, modelo 9701 provisto de electrodos de oxígeno y temperatura con precisión de ± 0.2 mg/l y ± 0.5 °C.
3. Demanda Química de Oxígeno (DQO).- Se determinó aplicando el método 5220 B del APHA (1992) con precisión de 7.8 mg/l.
4. Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO).- Se determinó aplicando la técnica descrita en APHA (1992).
5. Cloruros.- Se determinó por el método del tiocianato mercurico y espectrofotómetro Hach DR/2000. La valoración de Mohr en este caso no resultó un método factible.
6. CO₂.- Se determinó por cromatografía de gases en continuo con un cromatógrafo Perkin Elmer modelo 0.A AutoSyst XL. Utilizando una columna de tamiz molecular AH Plot SIDVE de 30m x 0.53m x 50 μ con una isoterma de 40 °C y un período de barrido de 5 min.
7. Temperatura.- Se mantuvo constante mediante una estufa con control de temperatura.
8. Carbono Orgánico Total (COT).- Se determinó empleando un equipo OIC modelo 700 siguiendo el método de combustión infrarrojo 5310 B del APHA (1992).

13.13. Condiciones Experimentales del Tratamiento Aerobio

Para determinar la actividad de biodegradación con precisión se aseguraron las siguientes condiciones experimentales, tanto en los matraces como en el reactor aerobio:

- Las condiciones de temperaturas aplicadas fueron 24 °C al inicio del proceso, posteriormente se fue incrementando hasta 30 °C verificando si existen incrementos en la tasa metabólica de degradación, utilizando para ello una estufa de temperatura controlada durante todo el experimento.

- Fue necesario mantener la concentración del BPC aminado (sustrato) por un sistema de recirculación a través de las membranas de silicona. De igual manera, fue necesario realizar la recirculación del medio mineral para homogeneizarlo y hacer posible la determinación de metabolitos formados por la biodegradación del contaminante.
- Se seleccionó la mezcla de micronutrientes y elementos traza más adecuada, realizando modificaciones al medio mineral propuesto por Livingston (1993), incrementando la cantidad del buffer para evitar que la biodegradación fuese inhibida debido a un descenso de pH en el medio, ocasionado por la presencia de altas concentraciones de ácidos orgánicos generados durante el proceso (Tabla VIII-1).

Tabla XIII-1.- Medio mineral utilizado en los reactores

Micronutrientes	mg / l	Elementos traza:	mg / l
KH_2PO_4	13,200	$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.14
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	14,200	Mn Cl_2	0.04
Na HCO_3	500	$\text{Co Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.20
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400	Cu Cl_2	0.02
Ca (OH)_2	62.7	$\text{Ni Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20	$\text{Na MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.06
Glucosa	3,000	H_3BO_4	0.04
Tiamina	1.0	Vitamina B_{12}	1.0
Ajustar pH = 7.2			

- Cada 24 horas se retiraron del reactor 500 ml de medio mineral para realizar las determinaciones de cloruros, DBO, DQO, extracción de metabolitos durante la biodegradación, restituyendo posteriormente la misma cantidad con medio nuevo.
- El rendimiento del proceso de biodegradación de los BPC aminados depende del tiempo de ensayo, por lo que su determinación fue diaria durante la primera semana, cada dos días durante la segunda y cada tres días durante las últimas semanas de ensayo. No se consideró el tiempo de colonización de las membranas en los reactores que para el caso particular fue de 10 días.
- No fue necesario considerar un período de aclimatación de la biomasa al sustrato, ya que el BPC aminado se encuentra separado de la biomasa por la membrana de silicona; que además de servir como soporte para el desarrollo de la biopelícula sirve como medio difusor (dosificación del sustrato) lo que impide concentraciones excesivas en la fase de la biopelícula
- En la última semana de tratamiento en el reactor aerobio, se adicionaron 10 ml de agente tensoactivo "Tween 20" a una concentración de 1% en volumen para determinar su efecto sobre la biodegradación de BPC aminado.

13.14. Técnica de Extracción de Metabolitos del Medio (Modificación de la Técnica del Quensen, 1990)

Se realizó la extracción de los metabolitos generados del proceso de biodegradación de los BPC aminados a diferentes tiempos. Se caracterizó además, la toxicidad de los subcompuestos así formados durante el tratamiento, para ello fue necesario realizar previamente la extracción de la fase orgánica del medio mineral mediante la siguiente técnica:

- ◆ Filtrar la muestra con filtro Watman 40 y si es necesario centrifugar a 8,000 rpm durante 10 min.
- ◆ Tomar 10 ml de muestra del medio líquido, añadir 10 ml de acetona y agitar durante 2 min.
- ◆ Realizar la extracción con 10 ml de hexano-acetona a una proporción de 9:1
- ◆ Añadir de 2 a 4 ml de ácido sulfúrico concentrado hasta pH 2
- ◆ Lavar con solución NaCl al 10%
- ◆ Extraer nuevamente con 10 ml de hexano-etilacetato a una proporción de 1:1
- ◆ Lavar con agua y NaCl al 2 %.
- ◆ Secar con Na₂SO₄ anhidro
- ◆ Purificar en columna de florisil
- ◆ Recuperar en 25 ml hexano
- ◆ Analizar por CG/EM.

Por último se preparó un blanco con medio mineral y hexano siguiendo la misma técnica de extracción descrita para comprobar la ausencia de interferencias en el proceso de cuantificación.

13.15. DETERMINACIÓN DE LA CARGA ORGÁNICA APLICADA

Para determinar la carga orgánica aplicada en los reactores, se aplicó la siguiente ecuación calculando la carga orgánica aplicada por unidad de superficie (área de biomembranas) obteniendo también, la carga orgánica eliminada y multiplicando por cien para obtener el rendimiento total del proceso de biodegradación en el sistema.

$$\text{Carga Orgánica} = \frac{\text{Masa aplicada (g)}}{\text{Area (m}^2\text{) * tiempo (días)}} \times 100 \%$$

13.16. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN.

El rendimiento del proceso de biodegradación fue determinado teniendo en cuenta la introducción de 20 ml de muestra de BPCs aminado en las membranas de cada uno de los reactores con una concentración inicial de 13011.92 ppm de pentaclorobifenilos, 137805.71 ppm de hexaclorobifenilos y 329494.91 ppm de heptaclorobifenilos.

El volumen del recipiente del reactor en donde se lleva a cabo la biodegradación es de 1.7 L. Los períodos de tratamiento fueron de 45 y 37 días para el proceso aerobio y anaerobio respectivamente, determinándose el volumen de BPCs que queda en el interior de las membranas sin ser biodegradado y la concentración final en el medio mineral después del período de tratamiento en cada uno de los reactores. Los cálculos se realizaron mediante la siguiente expresión:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} \times 100 \%$$

13.17. Microorganismos Utilizados

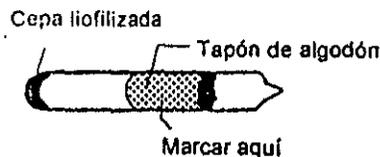
Las cepas utilizadas las proporcionaron la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia, España; los cultivos liofilizados se seleccionaron debido a que se identificaron por diferentes investigadores, como capaces de degradar mezclas de BPCs como se detalla en la tabla a continuación:

Cepa:	Medios de Cultivo	T°C	Características
<i>Alcaligenes eutrophus</i> .H850	1	30	Degrada BPCs
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .	1	30	Degrada BPCs
<i>Achromobacter</i> spp. strain P6	1	30	Degrada BPCs
<i>Aspergillus niger</i>	54	24	Hongo, degrada BPCs, β-hidroxilación
<i>Aspergillus versicolor</i> .	54	24	Hongo, degrada BPCs.
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (P. pyocynea).	2	37	Degrada BPCs, β-oxidación y ácido benzóico.
<i>Pseudomona putida</i> .	2	26	Degrada BPCs
<i>Pseudomona cepacia</i> . AC1100.	2	26	Degrada BPCs
<i>Pseudomona pseudoalcaligenes</i>	2	26	Degrada BPCs
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> .	63	24	Degrada BPCs, produce enzimas celulasas y peroxidases
<i>Nocardia uniformis</i> .	54	28	Degrada BPCs
<i>Clostridium cellulovorans</i>	91	37 Anaerobia	Degrada celulosa
<i>Clostridium papyrosolvans</i>	37	37 Anaerobia	Degrada celulosa,
<i>Clostridium bifermentans</i>	15	37 Anaerobia	Degrada celulosa
<i>Chaetomium globosum</i> .	54/62	24	Hongo, degrada celulosa
<i>Gliocladium virens</i>	54/64	24	Hongo, degrada p-nitrofenol
<i>Streptomyces badius</i> .	54/56	28	Degrada lignina
<i>Streptomyces setonii</i> .	54/56	28	Degrada lignina
<i>Streptomyces viridosporus</i> .	54/56	28	Degrada lignina
<i>Chaetomium virescens</i>	54/71	24	Hongo, degrada lignocelulosa
<i>Rhodococcus</i> sp.	1	26	Degrada nitritos.
<i>Neurospora crassa</i>	74/75	26	Transformación de comp. diazo
<i>Comamonas testosteronii</i>	2	30	Producción de comp. α-hidroxi
<i>Trichoderma reesei</i>	63	24	Degrada celulosa

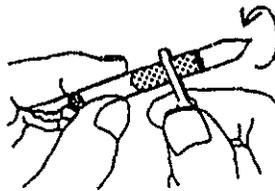
13.18. Medios Nutritivos

El desarrollo de las técnicas de microbiología se realizó en el área de Ecología del Dpto. de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio Ambiente de la Universidad de Cantabria. Las cepas se "despertaron" de las ampolletas de liofilización y se conservaron en placas de agar y tubos de ensayo con sus respectivos medios nutritivos descritos a continuación. La preparación de los medios específicos de cada cepa se realizó de acuerdo a lo establecido en el "Catálogo de Cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo" bajo la siguiente metodología:

- Determinar el mejor cultivo líquido para el microorganismo
- Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cepa
- Proporcionar la aireación ideal para el crecimiento.
- Abrir la ampolleta con una lima o diamante realizando un trazo profundo en la zona del tubo que lleva el algodón y en la mitad del mismo.



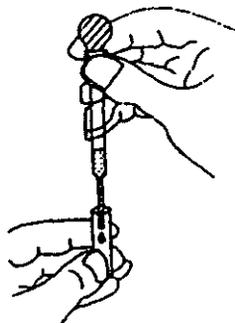
- Calentando al rojo una varilla de vidrio se aplica sobre el trazo rompiéndose así el vidrio del tubo, dejando que entre aire lentamente antes de quitar suavemente la parte superior de la ampolleta, el algodón debe quedar tapando la parte superior del tubo donde se encuentra el cultivo.



- Para realizar la suspensión del cultivo, inmediatamente después de abrir la ampolleta, añadir de 0.2 a 0.3 ml de medio líquido estéril con una pipeta Pasteur.



- Realizar la siembra en el medio de cultivo sólido mediante la aplicación de algunas gotas de la suspensión obtenida; el resto de la suspensión se vertió en el medio líquido, incubándose a la temperatura y oxigenación adecuada. Es aconsejable preparar más de un cultivo a partir de la suspensión.



MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS:

<i>Medio 1</i> <i>Agar nutritivo I.</i>	
Extracto de carne	10 g.
Peptona	10 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Ajustar pH a	7,2

<i>Medio 2</i> <i>Agar nutritivo II.</i>	
Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Ajustar pH	7,2

<i>Medio 15</i> <i>Caldo de Hígado.</i>	
Hígado de res cortado en trozos.	500 g
Agua destilada	1 L.
Dejar remojando por toda la noche el hígado en refrigeración. Eliminar la grasa, poner en autoclave por 15 min a 1 atm, separar el hígado y filtrar. Añadir al caldo.	
Peptona	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Ajustar a pH 8.0 Filtrar en papel y aforarlo a 1 L. añadir un poco de CaCO ₃ en cada tubo; agregar hígado y cubrir con el caldo.	

<i>Medio 37 Medio CM-3</i>	
K ₂ HPO ₄	2,9 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3 g
MgCl ₂ •6H ₂ O	1,0 g
CaCl ₂	0,15 g
FeSO ₄ (Sol.5%)	25 ml
Citrato de sodio	3 g
Extracto de lavadura	2 g
Resazurina (sol.0, 15)	2 ml
Cisteína HCl (sol.2,5%) (44 ml para medio sólido)	22 ml
Celobiosa	6 g
Agar	10 g
Agua destilada	1 L.
Ajustar pH a	7,2
<i>Medio 54 Agar dextrosa patata</i>	
Pedazos de papa	300 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Hervir los pedazos de papa en 500 ml de agua destilada, filtrar y llevar a 1 L. Añadir agar y glucosa.	

<i>Medio 56 Medio YEME (medio ISP 2)</i>	
Glucosa	4 g
Extracto de Levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Ajustar pH a	7,2

<i>Medio 63 Medio Agar malta (Blakeslee)</i>	
Extracto de malta	20 g
Dextrosa	20 g
Peptona micológica	1 g
Agar	16 g
Agua destilada	1 L

<i>Medio 91 Medio de Clostridium cellulolítico</i>	
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,5 g
CaCO ₃	2 g

NaCl	0,5 g
Resazurina	1 mg
Celulosa (pedazos de papel)	20 g
Agua destilada	1 g
Ajustar pH a	7,1

Medio 64
Agar Czapek (oxoid CM97)

13.19. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LOS REACTORES

Basándose el diseño del reactor de biomembrana construido por Cáceres (1996) y la experiencia del Equipo Biopelícula del Dpto. de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio Ambiente de la Universidad de Cantabria (España) se realizaron las adaptaciones y modificaciones pertinentes para la construcción de los reactores anaerobio y aerobio biomembrana, para conseguir un buen rendimiento de biodegradación de los bifenilos policlorados previamente aminados.

La utilización de los reactores convencionales existentes, fueron descartados en la presente investigación debido a sus bajos rendimientos de degradación, dificultad de controlar los parámetros de operación y tener periodos de retención muy prolongados.

Durante la etapa preliminar de diseño, se tomaron las primeras decisiones conceptuales, la disponibilidad de equipos y materiales, así como la preparación de la distribución física de los elementos de la planta. Los materiales que se utilizaron en la construcción de los reactores, fueron básicamente metacrilato y membranas de silicona y polipropileno de tipo tubular.

Entre las modificaciones más importantes realizadas al diseño del reactor aerobio de Cáceres (1996) se encuentran la utilización de membranas de silicona dispuestas en "U" y la instalación de una cámara superior de alimentación y recirculación del BPC aminado con tubos de metacrilato para la introducción de electrodos para el control de pH, Oxígeno disuelto, Temperatura y CO₂.

13.19.1. Consideraciones de Diseño de los Reactores

El diseño gráfico del sistema, se realizó por medio de un programa de computadora, mediante el *diseñador Corel Draw Versión 7* tomando en consideración los siguientes aspectos:

- Conseguir una mayor área específica de contacto entre el medio soporte y el contaminante.
- Establecer una distribución geométrica homogénea de las membranas en el soporte, con el fin de optimizar la hidrodinámica en el sistema. De este modo, se ha logrado constituir una simetría entre cada uno de los tubos de membrana.
- Considerar la separación entre las membranas de soporte, teniendo presente, el espesor de biopelícula que podría desarrollarse en dichos tubos, evitando así el posible bloqueo que

podiera presentarse debido a la excesiva acumulación de biomasa. Se ha limitado de este modo, el número de membranas que puedan conformar el elemento soporte.

- Mantener una relación diámetro-altura máxima de 1:2 en el soporte de los tubos, con el fin de procurar desarrollar dentro del reactor un sistema de régimen de flujo de mezcla completa, mediante un sistema de recirculación.
- Para la construcción de los reactores, se han empleado materiales de uso comercial con el fin de facilitar su adquisición y de abaratar los costos, cuidando las características específicas del diseño para asegurar su buen funcionamiento.

13.19.2. DESCRIPCIÓN DE LOS REACTORES BIOMEMBRANA

13.19.2.1. Reactor Aerobio

Durante la fase de construcción, las piezas de metacrilato, se cortaron en el torno de acuerdo a las medidas de diseño que se indican en las figuras XIII-6 y XIII-7. Se pulieron adecuadamente, a fin de lograr la mejor unión posible entre cada una de ellas, para posteriormente pegarlas con el pegamento colaplex[®], garantizando de esta manera una correcta retención en el reactor.

SOPORTE DE MEMBRANAS

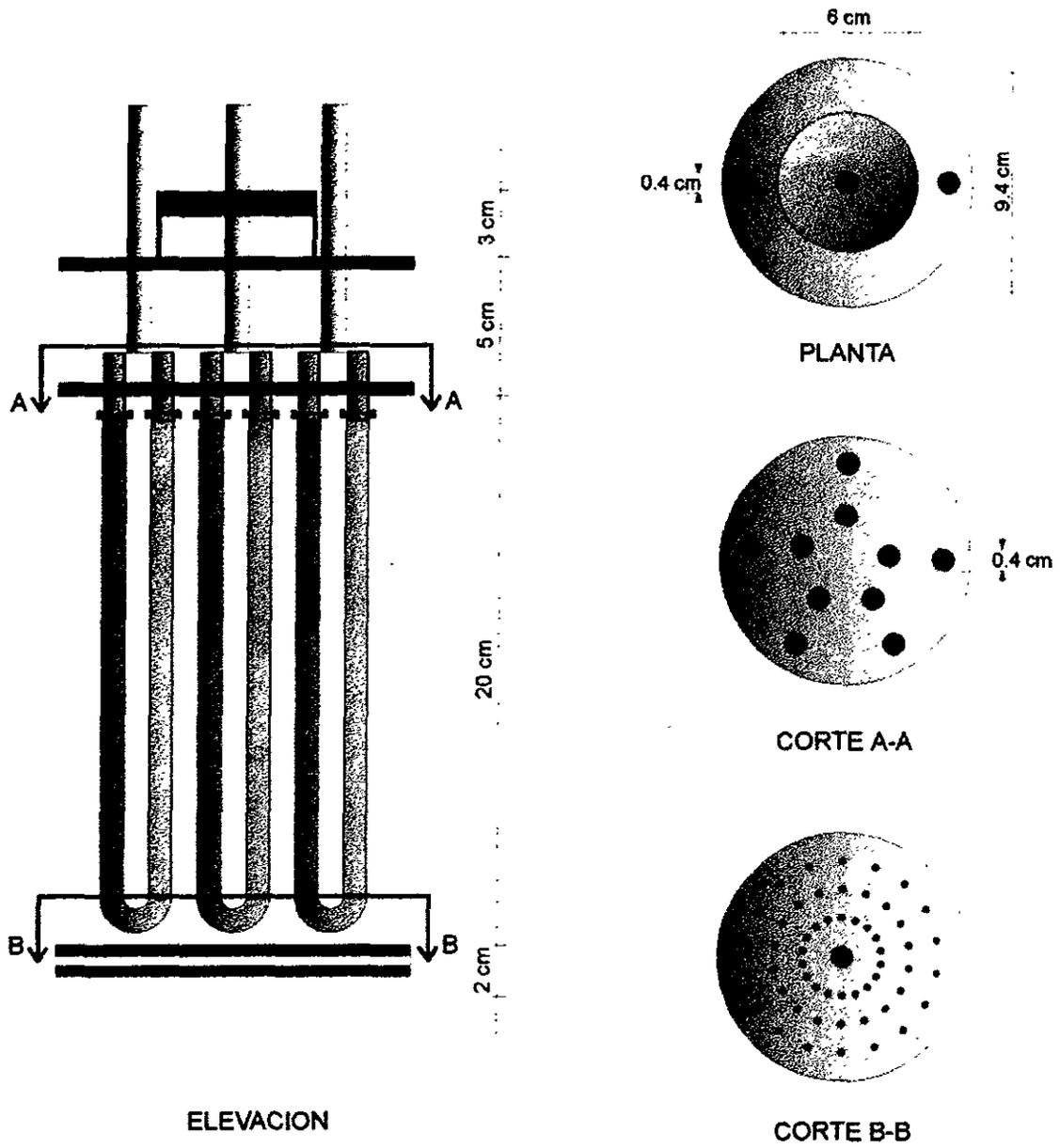
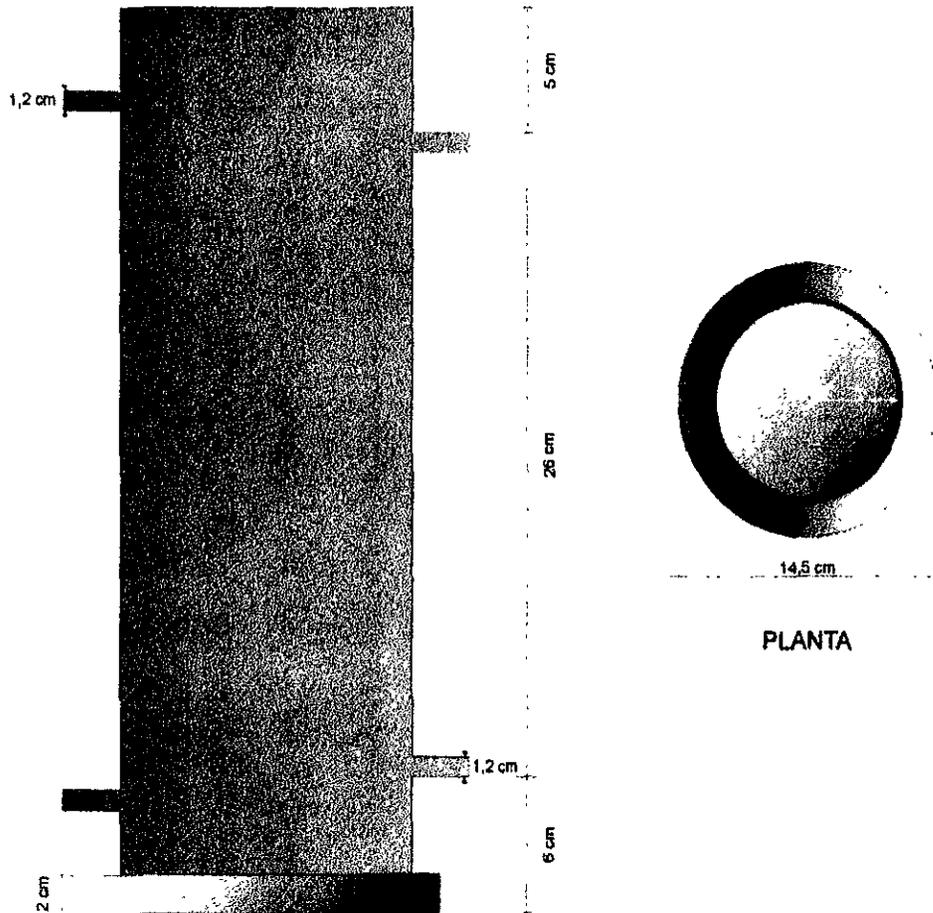


Fig. No. XIII-6.- Elemento estructural de soporte del reactor aerobio

VASIJA DE METACRILATO

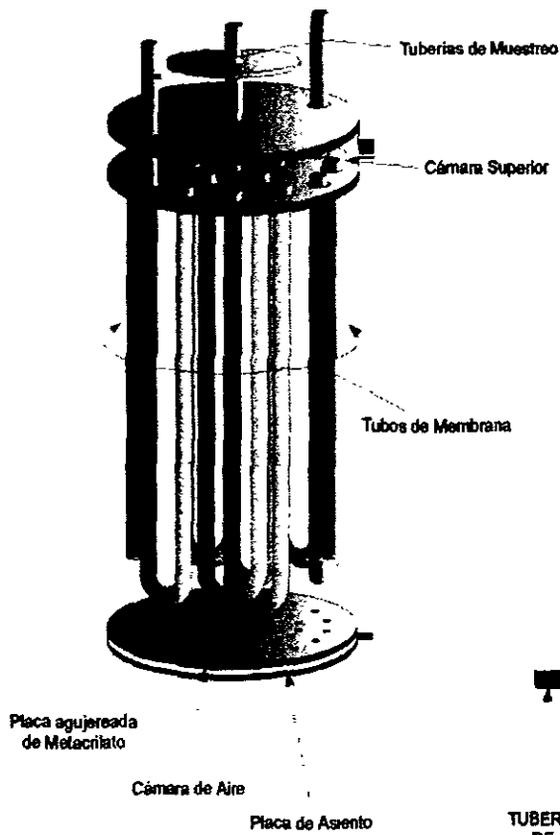


ELEVACION

Fig. No. XIII-7.- Vaso o recipiente del biorreactor

La configuración del biorreactor, sigue la línea circular cilíndrica, según se muestra en la figura XIII-8. Están formados por dos partes principales: soporte de las membranas y recipiente.

SOPORTE DE MEMBRANAS



VASIJA DE METACRILATO

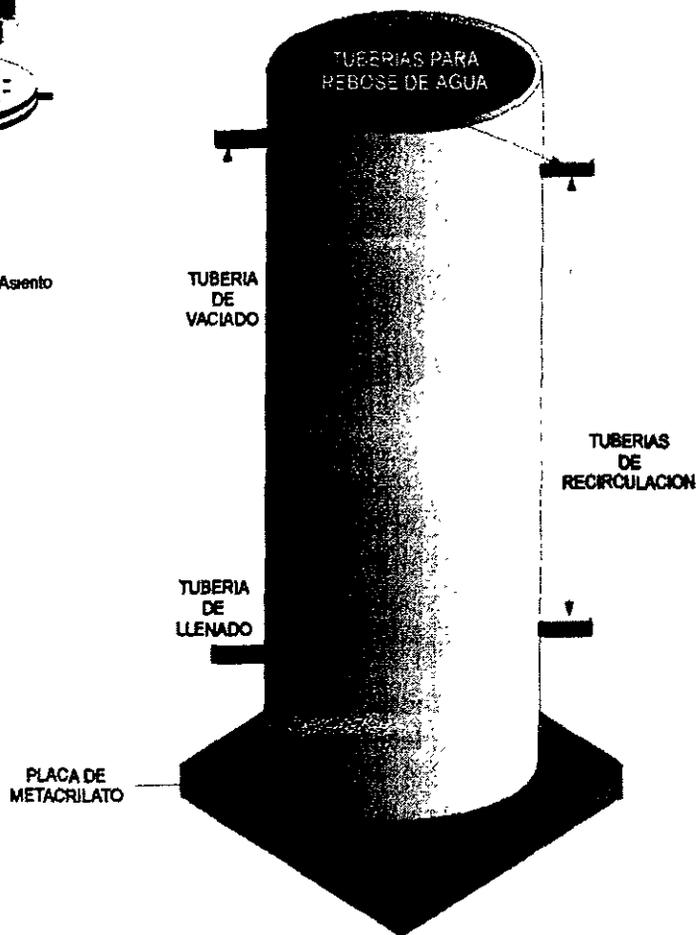


Fig.No. XIII-8.- Perspectiva de los elementos del reactor de biomembrana

13.19.2.2. Recipiente o vaso del reactor

Es el depósito cilíndrico formado por un tubo de metacrilato asentado sobre la cámara de aireación inferior. El tubo tiene un diámetro interno de 9.6 cm más 0.4 cm de espesor y una altura total de 35 cm, en cuya pared, se hicieron cuatro orificios de 1.2 cm de diámetro, utilizados principalmente, para el sistema de recirculación de agua, además del llenado y vaciado del sistema.

13.19.2.3. Soporte

El soporte, está integrado por dos cámaras: una cámara de aire en el extremo inferior y una cámara de recirculación de los BPCs aminados en la parte superior, cuya base sirve de soporte de los tubos para muestreo de los parámetros Oxígeno disuelto, pH y CO₂ en el extremo superior.

Entre éstas dos cámaras, se encuentra un sistema de tubos de membrana de silicona cilíndricas dispuestas en "U" de 30 cm de altura, que constituyen el verdadero material soporte, en donde se desarrolla la biopelícula.

Las membranas utilizadas como medio de soporte de la biopelícula presentan las siguientes características:

- MaterialSilicona.
- Diámetro interno4.0 mm.
- Diámetro externo4.5 mm.
- Espesor de la pared0.7 mm.

13.19.2.4. Cámara inferior de aireación

En parte inferior, el reactor posee una cámara de oxigenación constituida por un pequeño depósito rectangular de 10 cm x 8 cm x 1 cm construida de metacrilato con un pequeño tubo en un costado para la alimentación de oxígeno.

Sobre esta cámara se realizaron 18 agujeros con una broca de 2 mm de diámetro, que sirven para la oxigenación del sistema por burbujeo y fines de lavado y sobre la cual va asentado el vaso cilíndrico del reactor (detalle "B") (Figura XIII-9).

Una vez contruidos todos los elementos, se procedió al montaje de la cámara de aireación, procurando que la placa inferior quede completamente asentada en toda la longitud perimetral del vaso circular del reactor, comprobando así las posibles pérdidas que pudiera presentarse, y corrigiendo sobre la marcha todos los defectos que se producían con pegamento exclusivamente. El diseño de la cámara interna del reactor, mantiene una relación diámetro-altura de 2:1

13.19.2.5. Cámara superior de recirculación

Para construir el soporte se cortaron 5 tubos de membrana de silicona de 30 cm cada uno que se dispusieron en "U" con una altura total de 30 cm y un volumen de 44.15 ml.

Se requirió además de 10 pequeños pedazos de tubos de metacrilato de 3.5 mm de diámetro externo para el acople de las membranas y la unión a la cámara superior. Los tubos de acople, por el extremo superior del tubo de membrana, tienen una longitud de 2 cm, de los cuales 1 cm va insertado en la membrana, quedando el extremo superior al ras de la cámara de recirculación. Las uniones de los acoples a los tubos de silicona, se conectaron, pegaron y aseguraron con pequeñas abrazaderas de plástico, para garantizar la estanqueidad del sistema (Detalle "B").

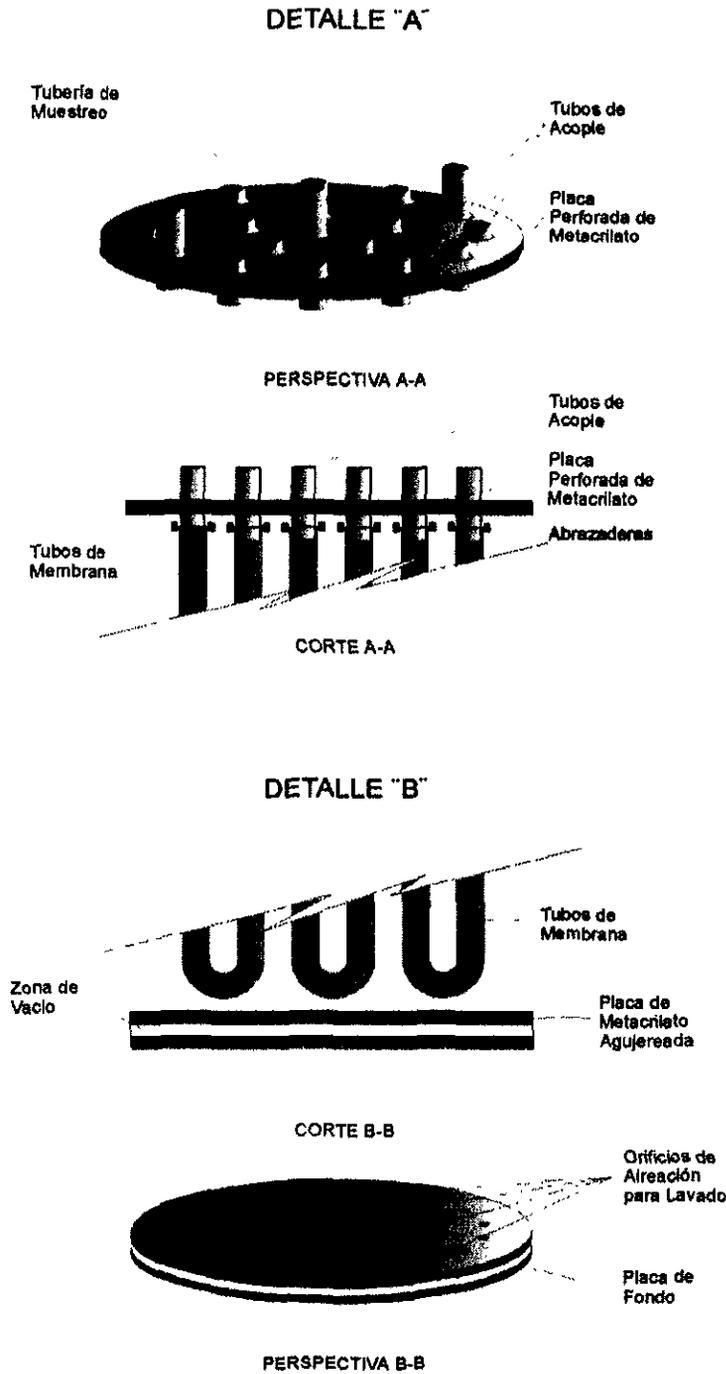


Fig. No. XIII-9.- Detalles de los cortes del reactor aerobio.

La cámara de recirculación de la parte superior tiene dimensiones de 1 cm de alto por 10 cm de diámetro, con un volumen de 78.5 ml construida de metacrilato, con el fondo de la dicha cámara asentada sobre el perímetro del anillo cilíndrico del cuerpo del reactor. El objetivo de esta cámara es mantener la concentración y homogeneización del BPC aminado dentro de la biomembrana.

Por lo tanto, el volumen total de la cámara de recirculación del BPC aminado es de 78.5 ml (de la cámara) + 44.15 ml (volumen de las membranas) + 44.15 L (de la línea de recirculación a partir de la bomba de 300 rpm. = 168 ml.

El reactor posee en la parte superior tres tubos de metacrilato para la introducción de los electrodos de análisis de temperatura, pH, medio mineral, CO₂ y oxígeno disuelto.

13.19.2.6. Montaje del soporte

Una vez construidas las dos cámaras, y dispuestos todos los tubos de membrana con sus respectivos acoples, se procedió al montaje de dicho elemento.

Se procedió a la conexión cada uno de los tubos de membrana, encajando y pegando primero los tubos de acople en la cámara superior; dejando transcurrir el tiempo requerido para alcanzar el endurecimiento e inmovilidad de las piezas; posteriormente, se instalaron cada uno de los tubos de silicona con sus respectivas abrazaderas, constituyendo de esta forma, un sistema de soporte de membranas completo.

13.19.2.7. Especificaciones de operación de los Reactores:

El funcionamiento y puesta en marcha de los reactores de biomembrana se inició bajo las mejores condiciones de operación proporcionando las condiciones necesarias para optimizar el rendimiento de biodegradación de los BPCs aminados.

Para determinar la viabilidad del sistemas de tratamiento aerobio fue preciso determinar ciertos parámetros básicos, como la concentración del BPC aminado óptima, la cual se mantuvo a 60% p/v, el tiempo de recirculación que fue de 12 h/d con gasto medio de 1.5 L/min; el tiempo de eliminación del metabolitos del sistema para evitar toxicidad que fue realizado diariamente durante la primera semana y posteriormente cada dos y tres días; alimentando de nuevo con medio mineral el reactor.

La adecuada operación del reactor exige la determinación periódica de los parámetros: pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, generación de cloruros y dióxido de carbono. Estos parámetros se determinaron analíticamente, mediante electrodos colocados en la parte superior del reactor y en el caso de la determinación de CO₂ en el reactor aerobio, se realizó mediante una línea de conducción directa al cromatógrafo de gases; la emisión cloruro al medio fue realizado por espectrofotometría con el método del tiocianato mercuríco siguiendo el la técnica del APHA (1992).

La oxigenación del reactor aerobio (80% de saturación de O₂) se realizó por burbujeo con oxígeno puro. El oxígeno y los nutrientes se difunden dentro de la biopelícula en sentidos opuestos a la difusión del BPC aminado.

La colonización del reactor anaerobio, se realizó utilizando agua residual urbana, tomada de la estación de bombeo de "Las Llamas" de la depuradora de Santander (España). La siembra, se realizó por inoculación diaria del agua residual previamente decantada en el seno del líquido

del reactor por un periodo de tres días. Durante la siembra se ha suministrado medio mineral con glucosa.

La siembra del reactor aerobio se llevó a cabo de manera similar que los bioensayos descritos anteriormente; en este reactor la adhesión de la biopelícula sobre los tubos de membrana toma una semana y el nivel del medio mineral dentro del reactor cubre completamente la biopelícula.

13.19.2.8. Sistema de alimentación de agua y micronutrientes

El reactor construido trabaja en flujo discontinuo (Batch). Una vez llenado el reactor, a partir de un depósito de almacenamiento que contiene los micronutrientes. Se procede a la recirculación del sistema por la acción de una bomba peristáltica de 17 L/h con el objetivo de homogeneizar el sistema durante un período de 20 horas diarias. Para la toma de muestras en la recirculación del vaso del reactor, el sistema dispone de una serie de accesorios, como son: uniones, derivaciones en T y llaves que permiten la toma de muestras en la línea de recirculación con un frecuencia de muestreo diaria durante la primera semana y posteriormente cada tres días (Figura XIII-10). Cada 24 horas se retiran 500 ml. del medio mineral del reactor a efecto de realizar la determinación de cloruro, extracción de metabolitos, enzimas, DBO y DQO; volviendo a restituir el volumen con nuevo medio.

13.19.2.9. Sistema de suministro de oxígeno

El suministro de oxígeno, se realizó por burbujeo a través de los pequeños orificios de la cámara de aireación inferior. El oxígeno entra a la cámara de oxigenación a través de una tubería de plástico de 6 mm de diámetro, conectada directamente al medidor de caudal del cilindro de oxígeno.

13.19.2. 10. Lavado de biopelícula

El sistema de lavado de la biopelícula, esta constituido por el flujo de aire a presión desde la cámara inferior de oxigenación hacia la parte interna de la cámara en donde, el aire que ingresa asciende por todos los orificios realizados en la placa; con un burbujeo intenso, lo que permite conseguir el lavado de la biopelícula adherida al medio soporte; sin tener que extraer dicho elemento del depósito para realizar esta operación.

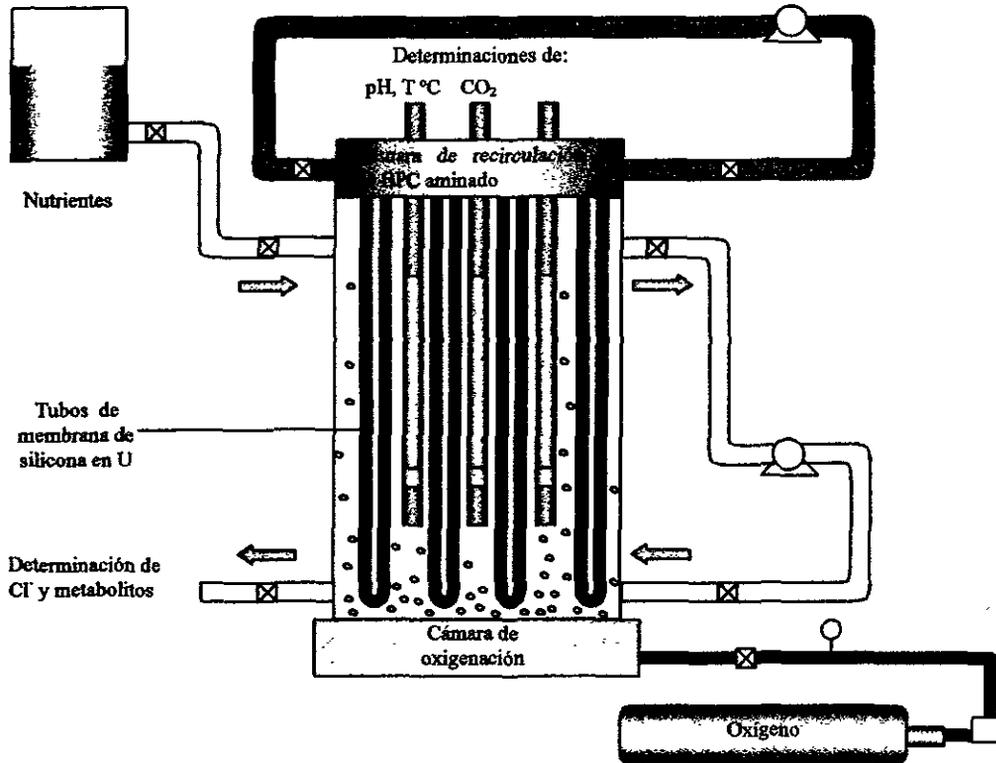


Fig. No. XIII-10.- Sistema de operación del reactor de biomembranas aerobio

13.20. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL REACTOR ANAEROBIO.-

El reactor anaerobio es similar en características y funcionamiento que el aerobio con la excepción de que la cámara superior es solo utilizada una vez para el barrido con nitrógeno para asegurar condiciones anaerobias y posteriormente como cámara de alimentación (Detalle "A"). Además, el tipo de membranas utilizadas es de polipropileno.

El soporte, está integrado por una cámara de alimentación del BPC aminado en la parte superior y una cámara que soporta las membranas ciegas en el extremo inferior (Detalle "B"); ambas separadas por un sistema de 17 tubos de membrana de polipropileno cilíndricas de 20 cm de longitud las cuales, constituyen el verdadero material soporte para el desarrollo de la biopelícula (Figura XIII-11) y que en conjunto forman a su vez, el elemento estructural de soporte.

Las membranas utilizadas como medio de soporte de la biopelícula son modelo Acuarel®PP y presentan las siguientes características:

- Material Polipropileno
- Tamaño de poro nominal 0,2 μm
- Tamaño máximo de poro < 0.65 μm
- Punto de burbuja > 0.95 bar
- Retención de *Pseudomona diminuta* (valor log de reducción) > 8
- Flujo transmembrana > 0.9 ml/min/cm²/bar
- Grosor medio de pared 1500 μm
- Rango de grosor de la pared 1350 - 1650 μm
- Diámetro intermedio medio 5500 μm
- Longitud específica (L_o)* 37,448 m/m²
- Rango de diámetro interno 5300-5700 μm
- Presión de implosión >2.5 bar
- Presión de explosión > 8 bar

* Longitud necesaria de tubos de fibra en función de los requerimientos del área de soporte.

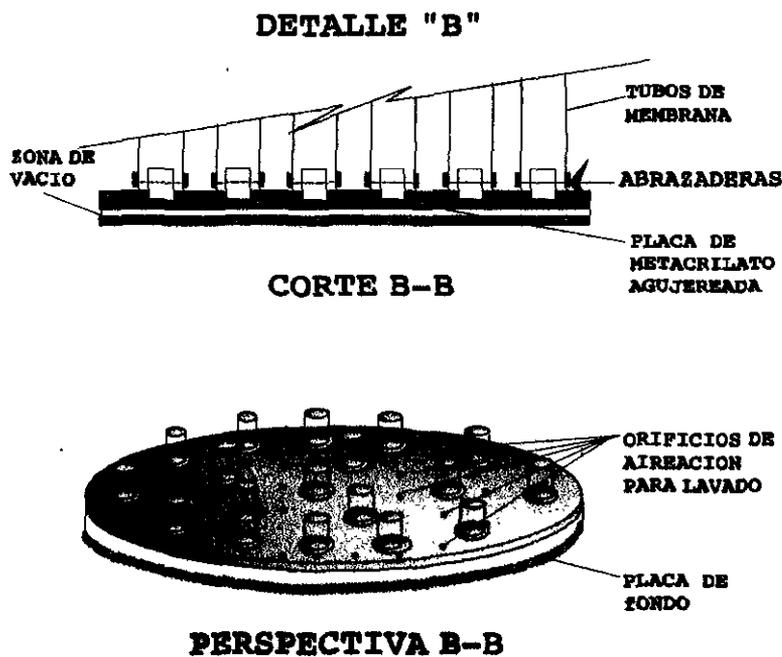


Fig. No. XIII- 11.- Detalles de los cortes A y B del reactor anaerobio.

En la parte superior derecha del panel, se encuentra colocada una llave de paso que permite la entrada del flujo de nitrógeno a través del tubo central del soporte, para cuando se precise realizar algún tipo de lavado en la biopelícula.

Para la toma de muestras, el reactor, dispone de una serie de accesorios como son, uniones, derivaciones en T y llaves que permiten la toma de muestra del afluente.

Durante la etapa de adaptación y colonización de la biopelícula se trabajó en flujo continuo es decir, se alimentó el reactor con agua residual urbana. Una vez desarrollada la biopelícula, se operó en flujo discontinuo durante toda la experimentación de biodegradación.

Capítulo XIV.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

14. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIONES

14.1 RENDIMIENTO DE LA NITRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES COMERCIALES DE AROCLOR®

Los resultados de la aplicación del programa matemático Matlab sobre el rendimiento de la nitración de los 209 isómeros de los estándares comerciales de los Aroclor®, dieron por resultado una mayor proporción de di-nitroclorobifenilos con un 78 %; un 27 % de mono-nitroclorobifenilos y sólo 3 % de clorobifenilos que no se nitrán; de los cuales, el 70 % de la nitración se realiza en la posición *para* y un 29 % en la posición *orto* aunque existe una pequeña proporción de nitración en la posición *meta* (anexo 1), lo cual ha sido confirmado por medio de los análisis de resonancia magnética nuclear. La tabla XIV-1 muestra el rendimiento de la nitración de los estándares de Aroclor®. Las tablas XIV-2 a XIV-6 presentan los programas de detección de masas utilizadas para determinar cada uno de los estándares de Aroclor® nitrados y aminados.

Aroclor®	No. de isómeros	Rendimiento de nitración (%)		
		Dinitrados	Mononitrados	Sin nitrar
1016	51	95	5	--
1242	85	95	5	--
1248	51	90	10	--
1254	67	82	18	--
1260	77	67	26	7

Tabla No. XIV-1.- Rendimiento de la nitración de los estándares de Aroclor®

Las deducciones más importantes obtenidas del proceso son:

- La mayoría de los congéneres mono y dinitrados se convirtieron a sus correspondientes grupos amino mediante el proceso de reducción con hidrazina.
- Durante el proceso de nitración y aminación puede tener lugar la labilización de los átomos de cloro vecinos.
- Las referencias bibliográficas sobre nitración de bifenilos policlorados, son muy escasas o inexistentes en las bases de datos; sólo ha sido posible localizar dos trabajos realizados al respecto en los cuales, la nitración y aminación del bifenilo policlorado estudiado tenía otros objetivos. Por lo que se considera que el presente trabajo de nitración de las mezclas comerciales de Aroclor® 1232, 1242, 1248, 1254 y 1260 propuesta y realizada en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México es un primer registro de estudio sobre la nitración de este tipo de compuestos.

14.1.1. Programas de detección de masas de los BPCs nitrados y aminados

Aroclor [®] 1232									
% y No. de Cl	No. de IUPAC	No. de isómero	Rango de masa Escaneada	Iones identificados	Iones cuantificadores	Iones identificados con un NH ₂	Iones identificados con dos NH ₂	Iones identificados con un NO ₂	Iones identificados con dos NO ₂
26 Mono-	1-3	3	186-190	188,190	188,190	203,205,	218,220,	233,235	278,280
29 Di-	4-15	121	220-226	222,224, 226	222, 224	237,239, 241,	252,254,256	267,269, 271	312,314, 316
24 Tri-	16-39	23	254-260	256,258, 260	258	271,273,2 75	286,288,290	301,303, 395	346,348, 350
15 Tetra-	40-81	41	288-294	290,292, 294	292, 294	305,307,3 09	320,322,324	335,337, 339	380,382, 384

Tabla No. XIV-2.- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor[®] 1232

Aroclor [®] 1242									
% y No. de Cl	No. de IUPAC	No. de isómeros	Rango de masa Escaneada	Iones identificados	Iones cuantificadores	Iones identificados con un NH ₂	Iones identificados con dos NH ₂	Iones identificados con un NO ₂	Iones identificados con dos NO ₂
1 Mono-	1-3	3	186-190	188,190	188,190	203,205	218,220	233,235	278,280
13 Di-	4-15	121	220-226	222,224, 226	222, 224	237,239,241	252,254,256,	267,269, 271	312,314, 316
45 Tri-	16-39	23	254-260	256,258, 260	258	271,273,275	286,288,290,	301,303, 395	346,348, 350
31 Tetra-	40-81	41	288-294	290,292, 294	292, 294	305,307,309	320,322,324	335,337, 339	380,382, 384
10 Penta-	82-127	39	322-328	324,326, 328	326, 328	339,341,343	354,356,358	369,371, 373	414,416, 418

Tabla No. XIV-3.- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor[®] 1242

Aroclor [®] 1248									
% y No. de Cl	No. de IUPAC	No. de isómeros	Rango de masa Escaneada	Iones identificados	Iones cuantificadores	Iones identificados con un NH ₂	Iones identificados con dos NH ₂	Iones identificados con un NO ₂	Iones identificados con dos NO ₂
1 Di-	4-15	121	220-226	222,224, 226	222,226	237,239,241	267,269,271	267,269,271	312,314,316
2 Tri-	16-39	23	254-260	256,258, 260	258	271,273,275,	301,303,395,	301,304,305	346,348,350
49 Tetra-	40-81	41	288-294	290,292, 294	292,294	305,307,309	335,337,339,	335,337,339	380,382,384

27 Penta-	82-127	39	322-328	324,326,328	326,328	339,341,343	369,371,373	369,371,373	414,416,418
2 Hexa-	128-169	31	356-364	354,360,362	360,364	373,375,377	403,405,407	403,405,407	448,450,452

Tabla No. XIV-4 .- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1248

Aroclor® 1254									
% y No. de Cl	No. de IUPAC	No. de isómeros	Rango de masa Escaneada	Iones identificados	Iones cuantificados	Iones identificados con un NH ₂	Iones identificados con dos NH ₂	Iones identificados con un NO ₂	Iones identificados con dos NO ₂
1 Tri-	16-39	23	254-260	256,258,260	258	271,273,275	286,288,290	301,304,305	346,348,350
15 Tetra-	40-81	41	288-294	290,292,294	292,294	305,307,309	320,322,324	335,337,339	380,382,384
53 Penta-	82-127	39	322-328	324,326,328	326,328	339,341,343	354,356,358	369,371,373	414,416,418
26 Hexa-	128-169	31	356-364	354,360,362	360,364	373,375,377	388,390,392	403,405,407	448,450,452
4 Hepta-	170-193	18	386-400	394,396,398	394,398	409,411,413	428,426,428	439,441,443	484,486,488

Tabla No. XIV-5 .- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1254

Aroclor® 1260									
% y No. de Cl	No. de IUPAC	No. de isómeros	Rango de masa Escaneada	Iones identificados	Iones cuantificados	Iones identificados con un NH ₂	Iones identificados con dos NH ₂	Iones identificados con un NO ₂	Iones identificados con dos NO ₂
12 Penta-	82-127	39	322-328	324,326,328	326,328	339,341,343	354,356,358	369,371,373	414,416,418
42 Hexa-	128-169	31	356-364	358,360,362	360,364	373,375,377	388,390,392	403,405,407	448,450,452
38 Hepta	170-193	18	386-400	392,396,398	392,398	409,411,413	428,426,428	437,441,443	482,486,488
7 Octa-	194-205	11	426-434	426,430,432	426,430,432	441,445,447	456,460,462	471,475,477	516,520,522
1 Nona	206-208	3	460-468	460,464,466,468	460,464,468	475,479,483		505,509,513	

Tabla No. XIV-6 .- Iones de identificación de los BPCs puros, nitrados y aminados del Aroclor® 1260

La confirmación del rendimiento de la nitración fue realizada en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México mediante el análisis de Cromatografía de CG/EM y RMN de los siguientes estándares de Aroclor®

14.1.2. Análisis Cromatográfico del Aroclor® 1248 Nitrado

La figura XIV-1 presenta el cromatograma del Aroclor® 1248 nitrado; los espectros de masas correspondientes de la identificación de sus picos principales, se encuentran representados en las figuras XIV-2 a XIV-5. La tabla XIV-7 muestra los resultados obtenidos de la nitración de cada uno de los compuestos del cromatograma y sus respectivos tiempos de retención; como se observa, los compuestos mononitrados con 8 isómeros aparecen desde el pico número 2 hasta el número 4 del cromatograma y los dinitrados desde el 5 al 8 con 10 isómeros.

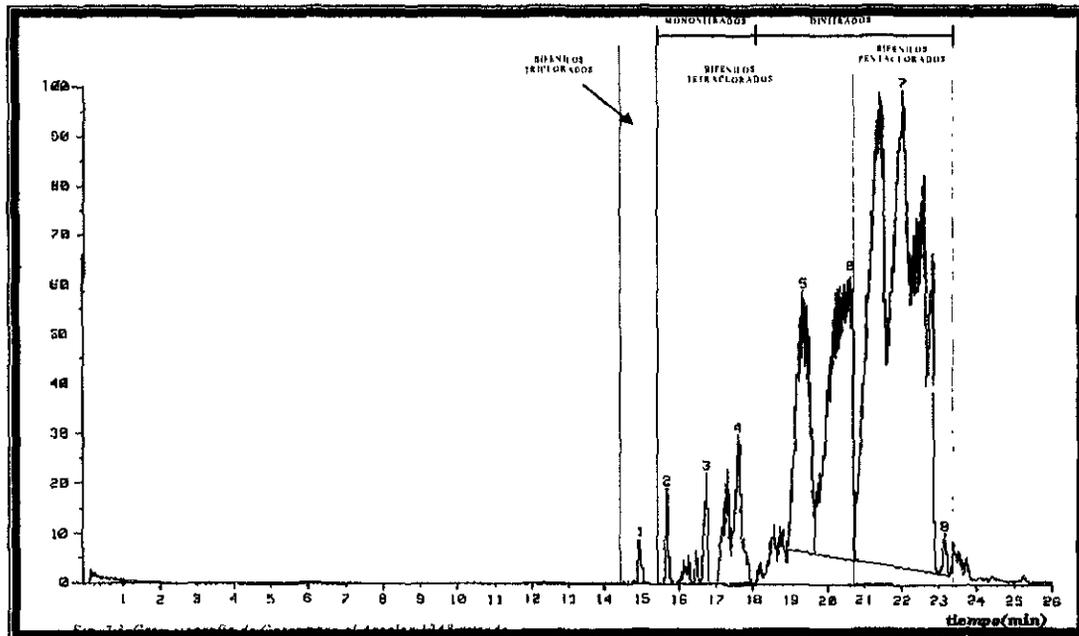


Fig.No. XIV-1.- Análisis cromatográfico del Aroclor® 1248 nitrado

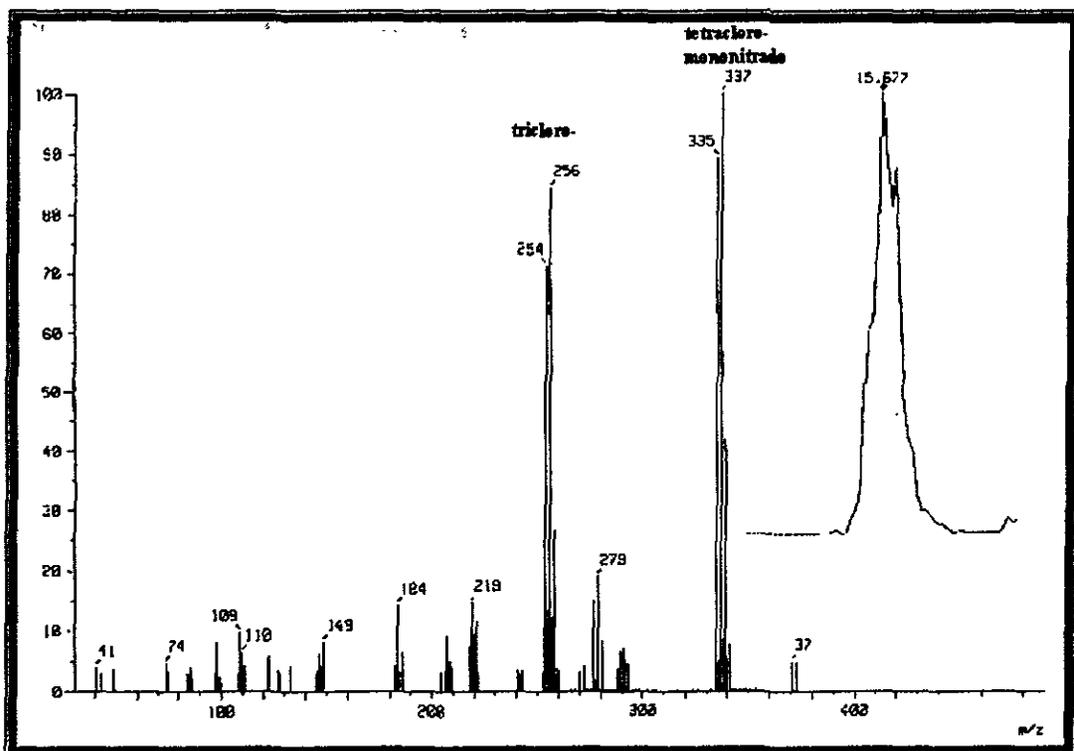
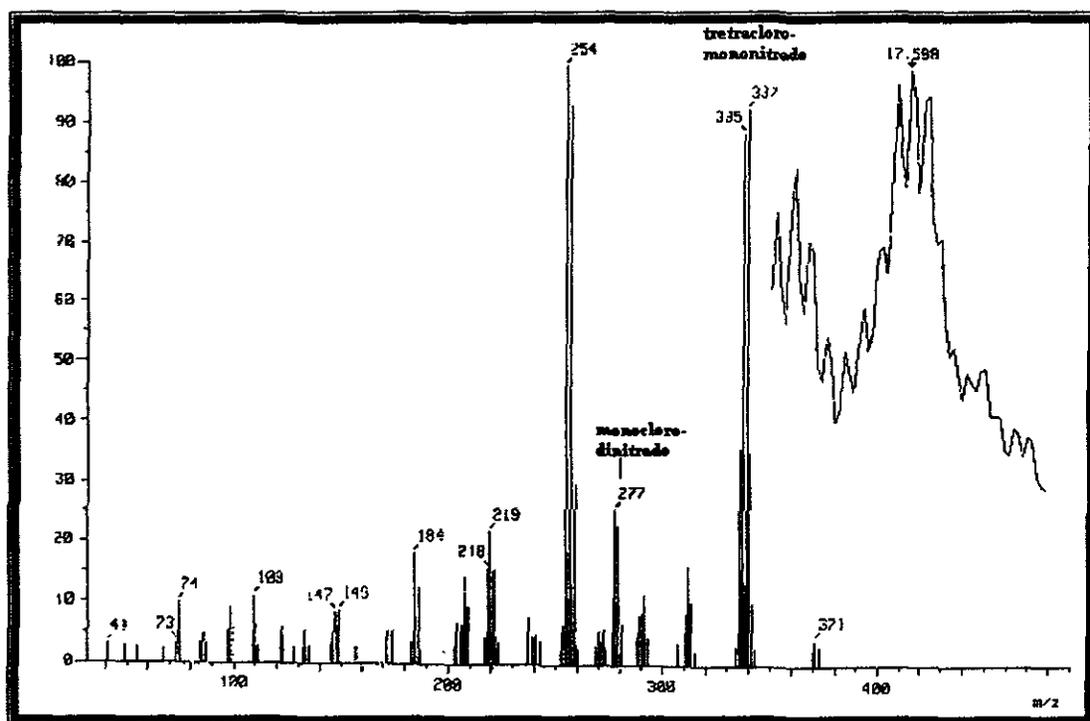


Fig.No. XIV-2.- Espectro de masas del Aroclor[®] 1248 nitrado (tetraclorado mononitrado)



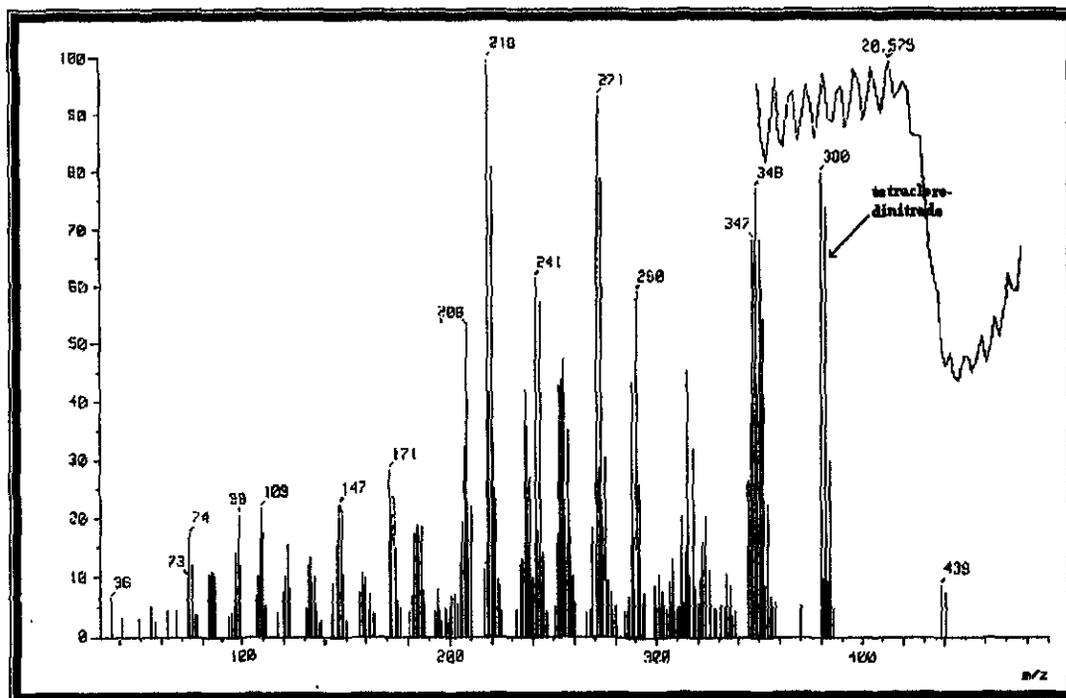
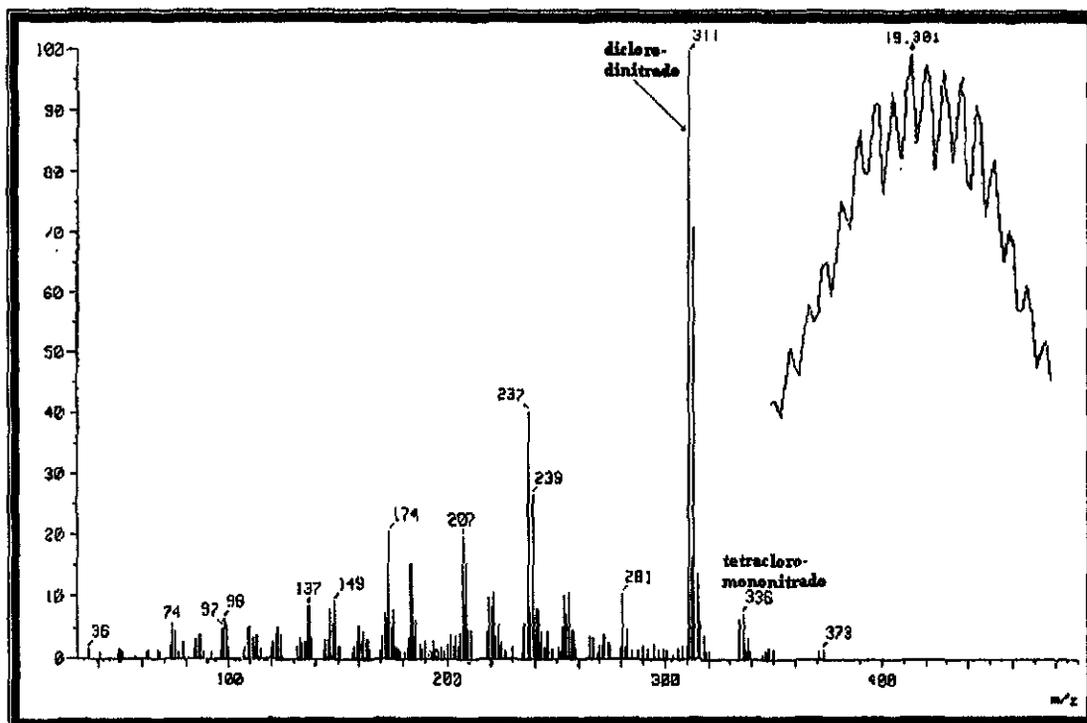


Fig. No. XIV-3.- Espectro de masas del Aroclor[®] 1248 nitrado (mono y diclorado dinitrado)

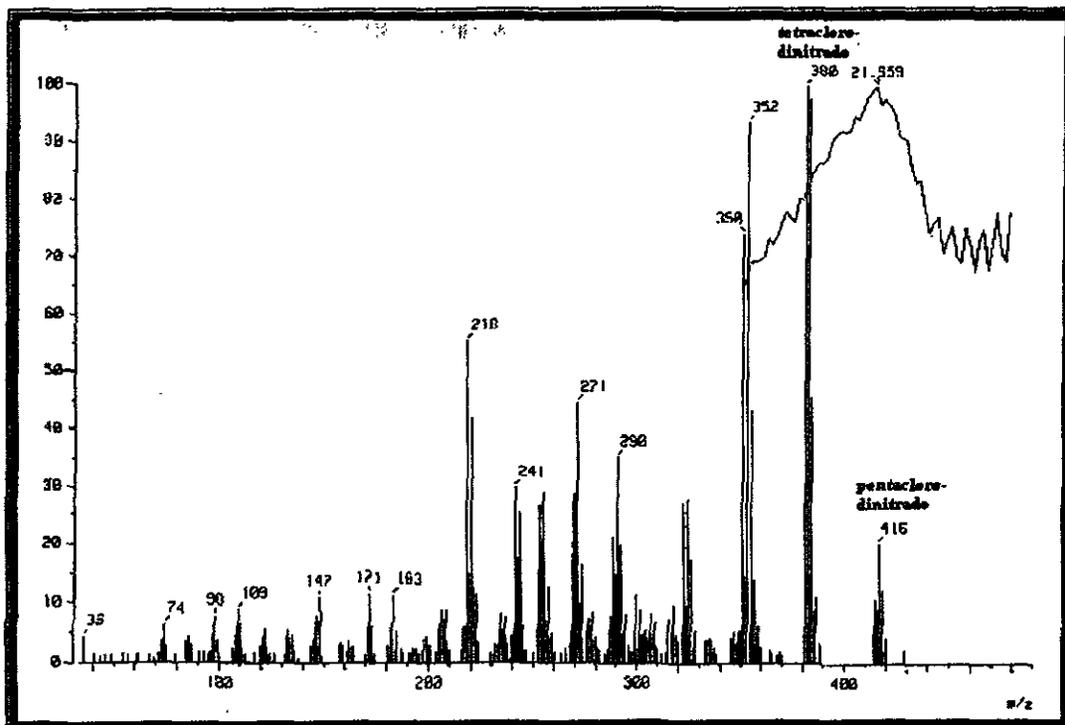


Fig. No. XIV-4.- Espectro de masa del Aroclor® 1248 nitrado (tetra y pentaclorado dinitrado)

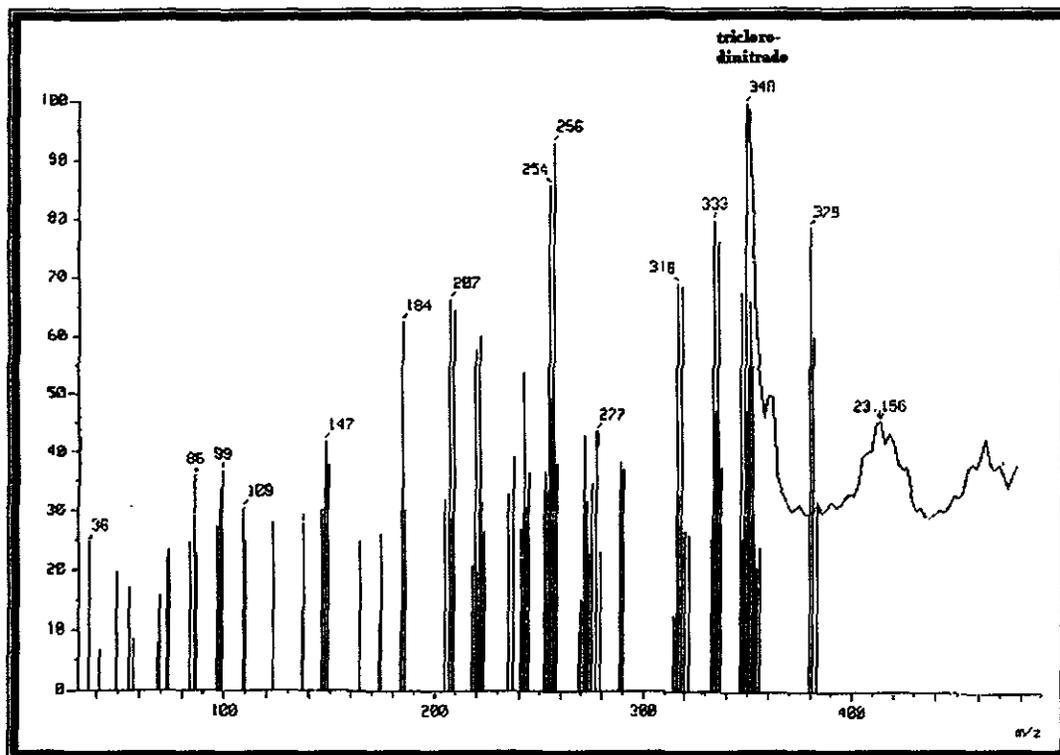


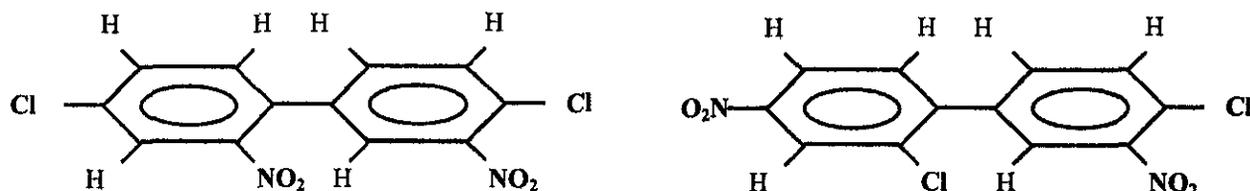
Fig. No. XIV-5.- Espectro de masas del Aroclor® 1248 nitrado (tricolorado dinitrado)

Tabla No. XIV-7.- Tiempos de retención de los congéneres del Aroclor® 1248 nitrado.

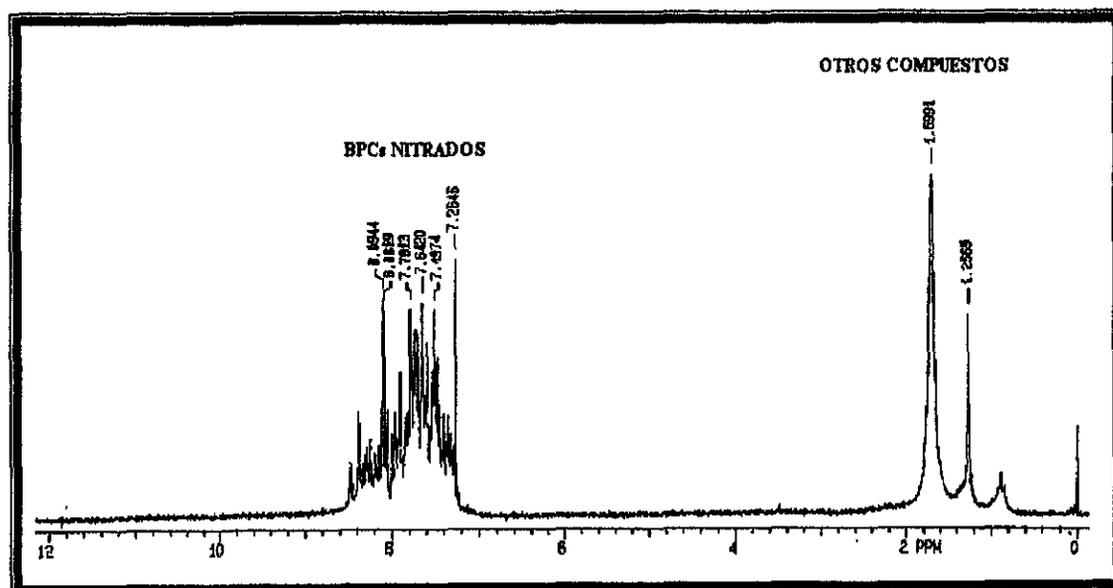
Pico	Tiempo de Retención (min)	Nº. de Cloros	Grupos Nitro	Masa Molar	Nombre
1	14.95	3		256	Triclorobifenilo
2	15.68	4	1	336	Tetraclorobifenilo mononitrado
3	16.73	4	1	336	Tetraclorobifenilo mononitrado
4	17.59	4	2	380	Tetraclorobifenilo dinitrado
5	19.30	4	2	380	Tetraclorobifenilo dinitrado
6	20.58	4	2	380	Tetraclorobifenilo dinitrado
7	21.96	5	2	416	Pentaclorobifenilo dinitrado
8	23.16	5	2	416	Pentaclorobifenilo dinitrado

14.1.3. Resonancia Magnética Nuclear del Aroclor® 1248 nitrado

Los análisis de las relaciones de áreas realizados por Resonancia Magnética Nuclear del ^1H y ^{13}C (Figuras XIV-6 y XIV-7) confirma la nitración de la molécula de BPC. El espectro del ^1H muestra la existencia de compuestos dinitrados de la forma:



En los cuales existen 3 átomos de hidrógeno vecinos por átomo de cloro, y 1 átomo de hidrógeno vecino por átomo de grupo nitro. Además, el espectro de ^{13}C (figura XIV-7) demuestra la existencia de un carbono sustituido por cloro por cada carbono sustituido por un grupo nitro.



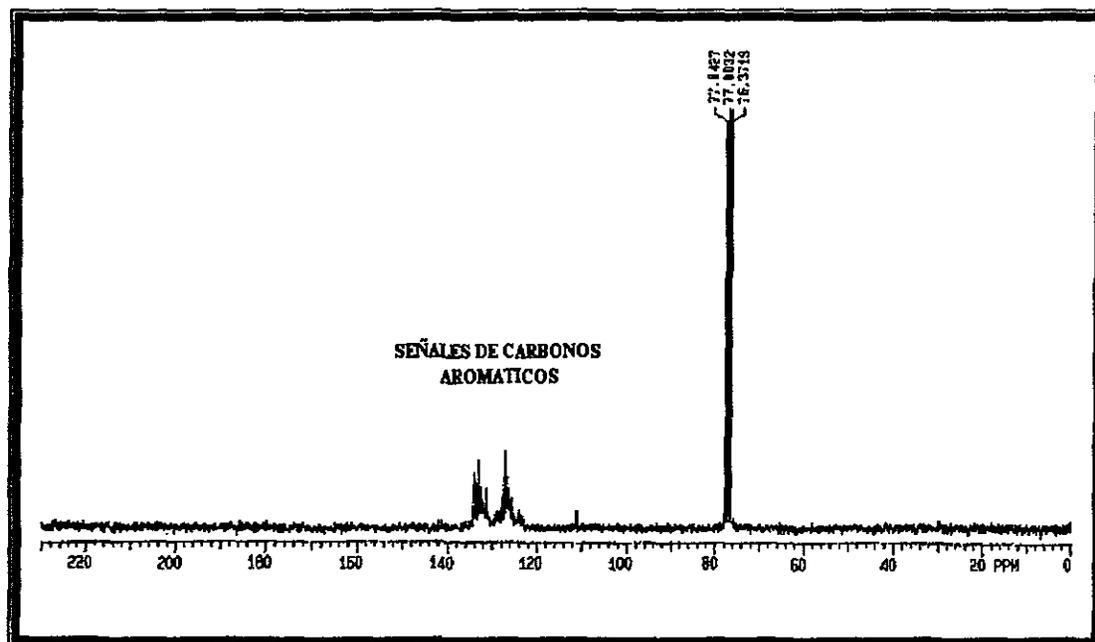
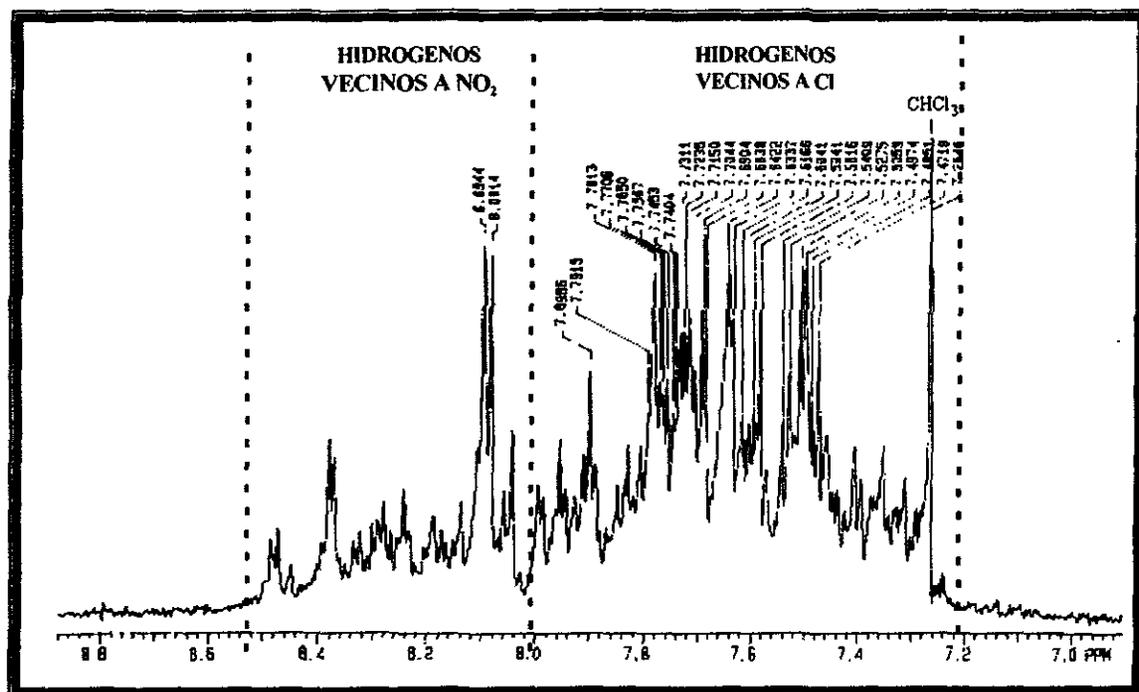


Fig. No. XIV-6.- RMN por ¹H del Aroclor® 1248 nitrado.

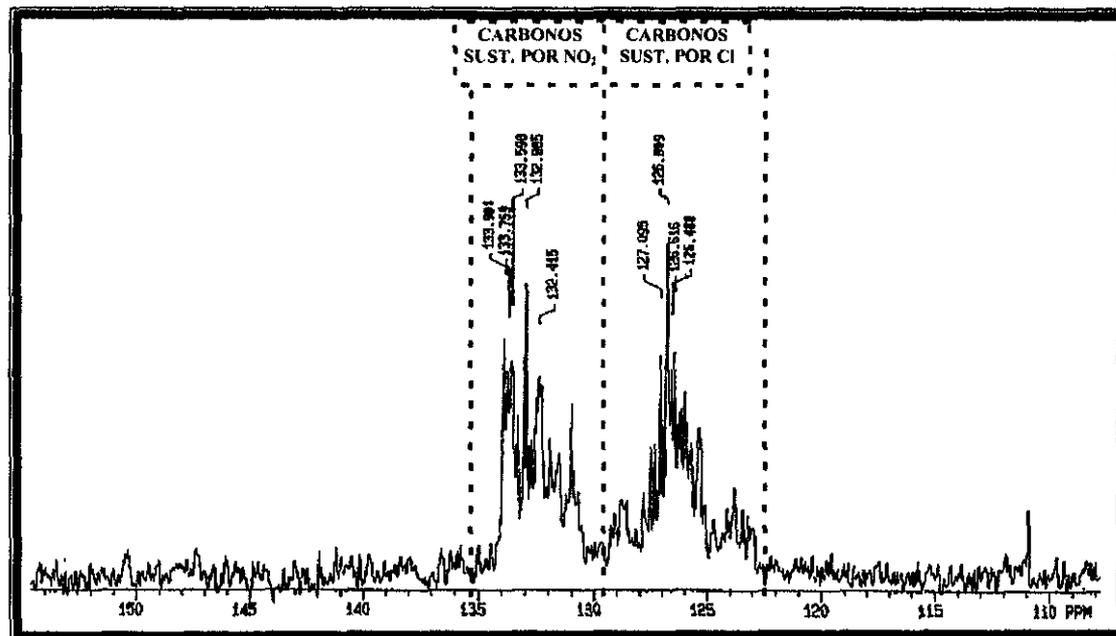


Fig. No. XIV-7.- Análisis de Resonancia Magnética Nuclear por ^{13}C del Aroclor[®] 1248 nitrado

14.1.4. Análisis Cromatográfico del Aroclor[®] 1254 Nitrado

La figura XIV-8 presenta el cromatograma del Aroclor[®] 1254 nitrado; los espectros de masas correspondientes de la identificación de sus picos principales, se encuentran representados en las figuras XIV-9 y XIV-10; como se observa, los compuestos mononitrados aparecen desde el pico número 2 hasta el número 4 del cromatograma y los dinitrados desde el 5 al 6; los picos 1 y 7 corresponden a clorobifenilos no nitrados.

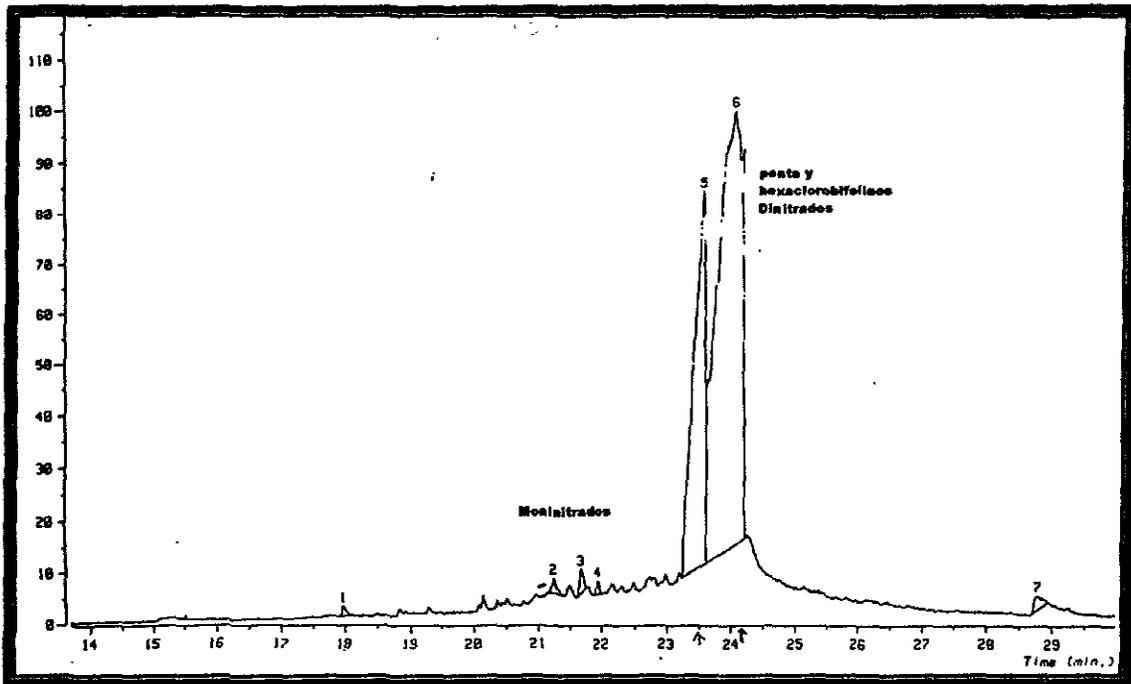


Fig. No.XIV-8.- Análisis cromatográfico del Aroclor® 1254 nitrado

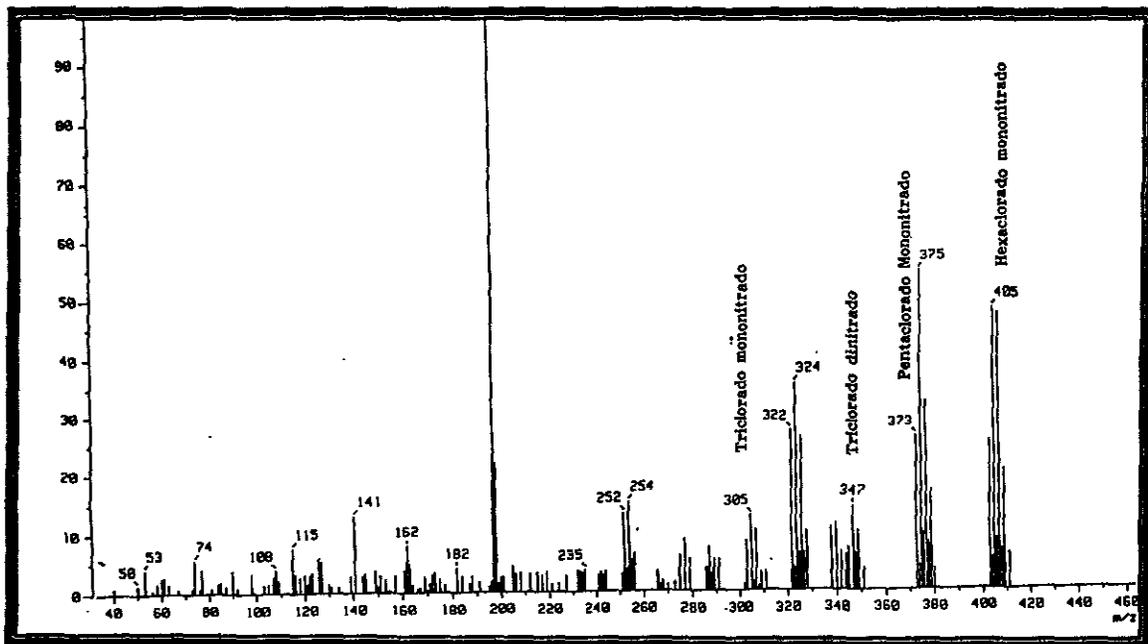


Fig.No. XIV-9.- Espectros de masas del Aroclor® 1254 nitrado

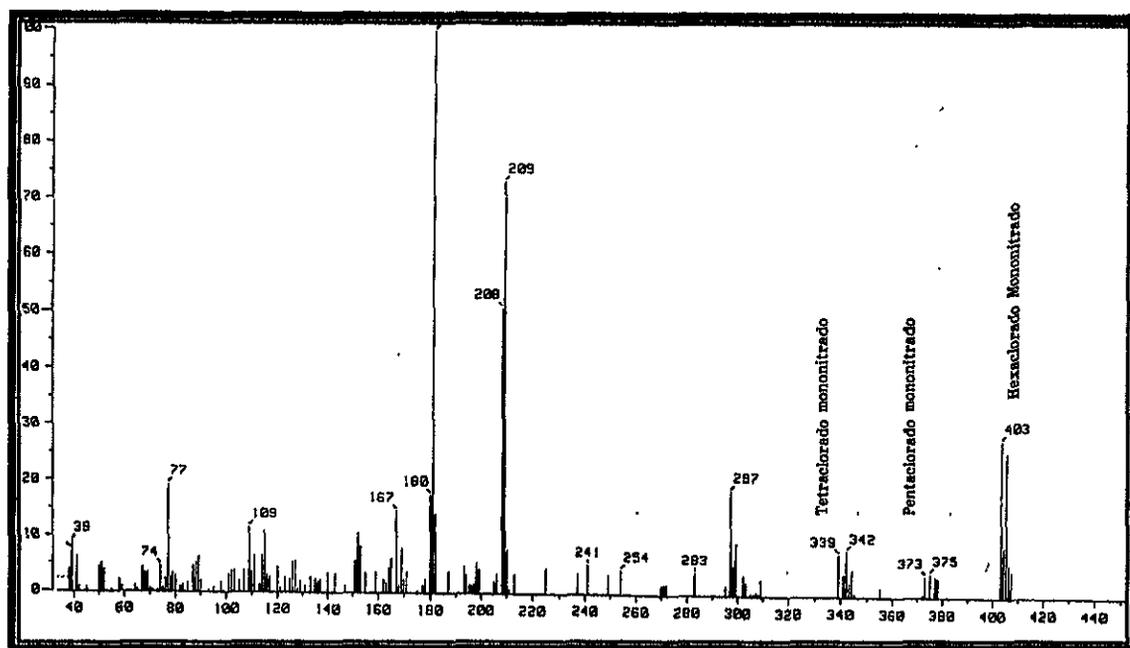
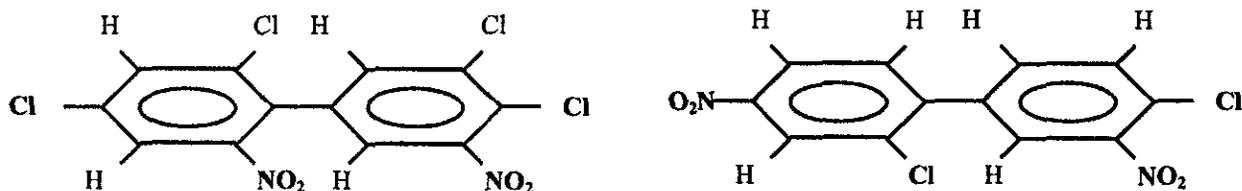


Fig.No. XIV-10.- Espectros de masas del Aroclor® 1254 nitrado

14.1.5. Resonancia Magnética Nuclear del Aroclor® 1254 nitrado

Los análisis de las relaciones de áreas realizados por Resonancia Magnética Nuclear del ^1H y ^{13}C confirman la nitración de la molécula del Aroclor® 1254. El espectro del ^1H (figura XIV-11) muestra la existencia de compuestos dinitrados de la forma:



En los cuales, existen 3 átomos de hidrógeno vecinos por átomo de cloro, y 1 átomo de hidrógeno vecino por átomo de grupo nitro. Además, el espectro de ^{13}C (figura XIV-12) demuestra la existencia de un carbono sustituido por cloro por cada carbono sustituido por un grupo nitro.

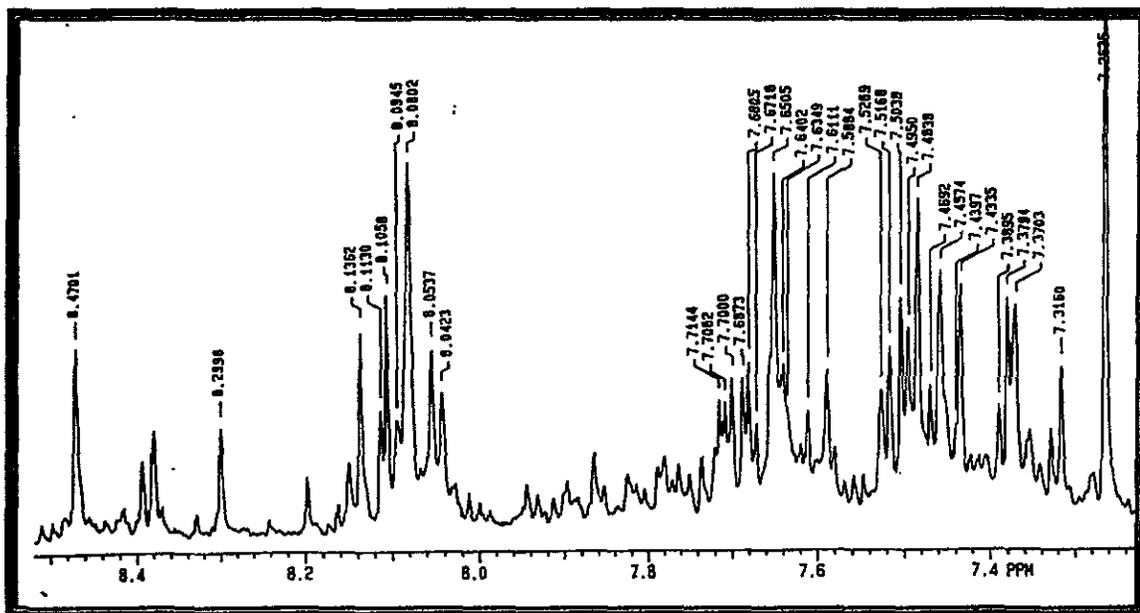


Fig. No. XIV-11.- Análisis de Resonancia Magnética Nuclear por ^1H del Aroclor 1254 nitrado

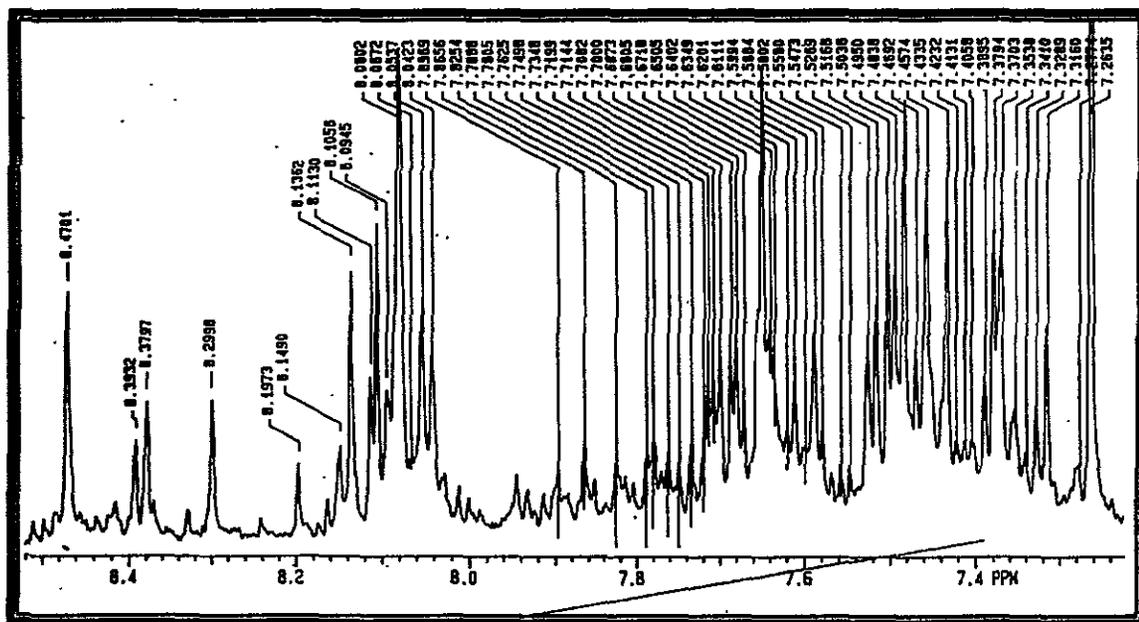


Fig. No. XIV-12.- Análisis de Resonancia Magnética Nuclear por ^{13}C del Aroclor 1254 nitrado

14.2. CONCENTRACIÓN DE BPCs EN MUESTRAS DE ACEITES DIELECTRICOS

La concentración de bifenilos policlorados en las muestras de aceite dieléctrico realizada por diferencia de peso, determinó que el aceite posee un 94% en peso de BPCs y el resto es aceite mineral. El peso promedio de las diferentes muestras de BPC puro, nitrado y aminado se presenta en la tabla XIV-8.

Muestra.	Cantidad de muestra:	Peso promedio en g.
BPC puro	10 ml	12.231
BPC nitrado	10 ml	13.075
BPC aminado	10 ml	12.875

Tabla No. XIV-8.- Peso promedio del BPC puro, nitrado y aminado

14.3. IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL BPC PURO POR CG/EM

La caracterización analítica de los BPCs a partir de las muestras de aceites dieléctricos realizada por cromatografía CG/EM ha dado por resultado una gran concentración de los congéneres tetra, penta, hexa, hepta y octaclorados característicos del Aroclor[®] 1260 en este tipo de aceites. La determinación analítica de los BPCs, basada en las relaciones entre los tiempos de retención y la estructura química de cada uno de los compuestos de la mezcla y las rectas de calibrado correspondientes, se presentan en la tabla XIV-9. El análisis reveló además, la presencia de pequeñas cantidades de clorobenzenos los cuales, se separaron posteriormente por purificación en columna de florisil. En la figura XIV-13, se presenta el análisis cromatográfico de los cinco componentes principales del BPC puro.

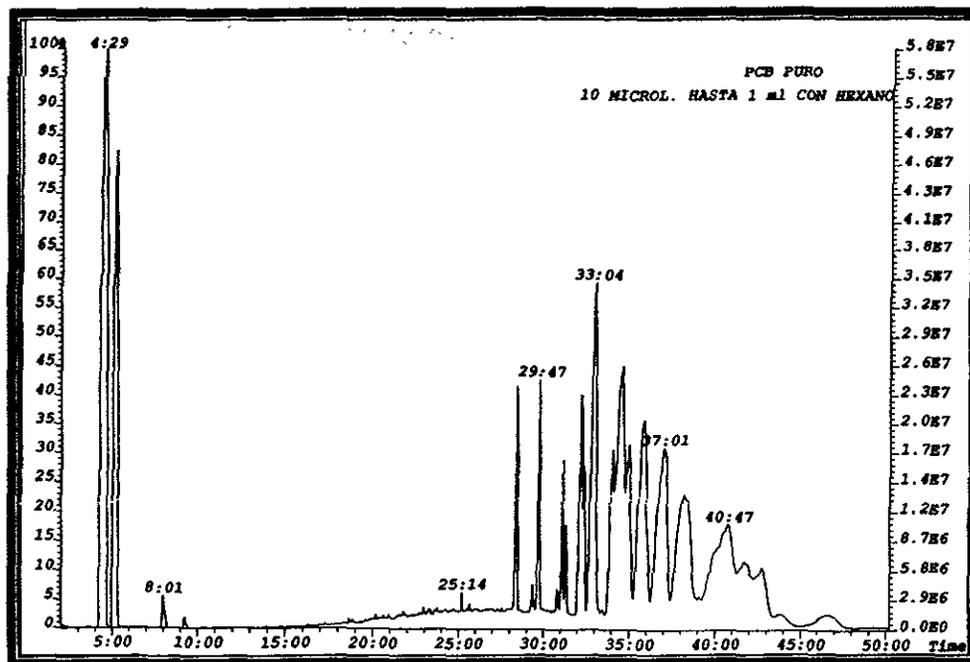


Fig. No.XIV-13.- Análisis cromatográfico de los BPCs puros

Tiempo de Retención (min)	Congénere	Recta de Calibrado
25:14	Tetraclorobifenilo	Y= 62581X-126647; R ² =0.9733
28:27	Pentaclorobifenilo	Y=586620X-127103; R ² =0.9749
29:23	Pentaclorobifenilo	Y=586620X-127103; R ² =0.9749
29:47	Pentaclorobifenilo	Y=586620X-127103; R ² =0.9749
30:50	Pentaclorobifenilo	Y=586620X-127103; R ² =0.9749
31:10	Hexaclorobifenilo	Y= 509999X-84379; R ² =0.9648
31:22	Pentaclorobifenilo	Y=586620X-127103; R ² =0.9749
32:14	Hexaclorobifenilo	Y= 509999X-84379; R ² =0.9648
32:25	Hexaclorobifenilo	Y= 509999X-84379; R ² =0.9648
33:04	Hexaclorobifenilo	Y= 509999X-84379; R ² =0.9648
34:03	Hexaclorobifenilo	Y= 509999X-84379; R ² =0.9648
34:36	Hexaclorobifenilo	Y= 509999X-84379; R ² =0.9648
34:59	Hexa+heptacloro	sin cuantificar
35:53	Hexaclorobifenilo	Y= 509999X-84379; R ² =0.9648
37:01	Heptaclorobifenilo	Y=277383X-97452; R ² =0.9779
38:13	Heptaclorobifenilo	Y=277383X-97452; R ² =0.9779
40:47	Heptaclorobifenilo	Y=277383X-97452; R ² =0.9779
41:43	Hepta+octacloro	sin cuantificar
42:45	Octaclorobifenilo	sin cuantificar
43:44	Octaclorobifenilo	sin cuantificar
46:37	Octaclorobifenilo	sin cuantificar

Tabla No.XIV-9.- Tiempos de retención y rectas de calibrado del los congéneres de BPC puro

La tabla XIV-10 muestra los congéneres e isómeros analizados mediante esta técnica cromatográfica. En el cromatograma se observa que los congéneres de BPC puro que aparecen con buena resolución corresponden a los isómeros: 53 de los tetraclorobifenilos; 99, 100 y 117 de los pentaclorobifenilos; 129, 136, 141 y 169 de los hexaclorobifenilos; 181, 182, 186 y 187 de los heptaclorobifenilos y 194, 195, 196, 198, y 200 de los octaclorobifenilos según la numeración sistemática de BPCs propuesta por Ballschmiter y Zell (1980) y aceptada por IUPAC; siendo

relativamente más abundantes las masas de los congéneres heptaclorobifenilos seguido en abundancia por los hexacloro bifenilos. Se observa además, que existen dos componentes que eluyen juntos y corresponden a los congéneres hexa+heptacloro bifenilos y hepta+octaclorobifenilos que no fueron cuantificados; además, existen en muy baja concentración nonaclorobifenilos como para ser identificados con facilidad.

Isómero	Nombre	Número IUPAC	Masa de identificación
2,2',5,6	Tetraclorobifenilo	53	292
2,2',4,4',5	Pentaclorobifenilo	99	326
2,2',4,4',6	Pentaclorobifenilo	100	326
2,3,4',5,6	Pentaclorobifenilo	117	326
3,3',4,4',5,5'	Hexaclorobifenilo	169	360
2,2',3,4,5,5'	Hexaclorobifenilo	141	360
2,2',3,3',4,4'	Hexaclorobifenilo	129	360
2,2',3,3',6,6'	Hexaclorobifenilo	136	360
2,2',3,4,5,6,6'	Heptaclorobifenilo	186	394
2,2',3,4',5,5',6	Heptaclorobifenilo	187	394
2,2',3,4,4',5,6	Heptaclorobifenilo	181	394
2,2',3,4,4',5,6'	Heptaclorobifenilo	182	394
2,2',3,3',4,4',5,6'	Octaclorobifenilo	196	430
2,2',3,3',4,4',5,5'	Octaclorobifenilo	194	430
2,2',3,3',4,5',6,6'	Octaclorobifenilo	200	430
2,2',3,3',4,5,5',6	Octaclorobifenilo	198	430
2,2',3,3',4,4',5,6	Octaclorobifenilo	195	430

Tabla No. XIV-10.- Análisis cualitativo de bifenilos policlorados puros

14.4. IDENTIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE BPCs NITRADOS Y AMINADOS POR CG/EM

Indudablemente, las ventajas de las técnicas de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para determinar BPCs, son las que más posibilidades poseen como herramienta de investigación en la identificación de este tipo de compuestos. Los experimentos realizados han proporcionado nuevos resultados hasta el momento sobre el comportamiento cromatográfico de los BPCs nitrados y aminados que se han comentado a lo largo de la exposición; no obstante, es necesario realizar una recapitulación final para destacar los aspectos de mayor interés:

La identificación de los picos de cada uno de los congéneres de BPC aminado estaba planeado en principio como procedimiento rutinario. Sin embargo, fue necesario estudiar las relaciones entre la estructura química y el comportamiento cromatográfico; debido a que en la librería interna del espectrómetro de masas, no existen espectros de masa para BPCs nitrados ni aminados. De igual manera, al realizar la correspondiente búsqueda bibliográfica en el Chemical Abstracts Register, resultó sorprendente la escasez de datos publicados sobre nitración y reducción a amina de BPCs ya que los únicos artículos encontrados se refieren a la nitración del 3,3',4,4'-tetraclorobifenilo (Chaudhary,1978), 4-clorobifenilo y 2,'3,'4,'5'-tetraclorobifenilo (Donnelly, 1987).

Uno de los temas más interesantes que se desprendieron de la investigación es indudablemente, la correlación entre la nueva estructura química y los tiempos de retención cromatográfica de los BPCs aminados por las dificultades que esto plantea, tema que es sumamente atrayente, no sólo por la posibilidad de aportar nuevos datos de interés teórico en técnicas cromatográficas, sino también por la utilidad de datos obtenidos para el propio proceso de biodegradación.

Para la identificación de los componentes de los BPCs nitrados y aminados, se recurrió también a la espectrometría de masas con el mismo programa cromatográfico anterior; sin embargo, no se detectaron sus espectros correspondientes debido a la falta de registros CAS en la librería interna del equipo de masas para referir estos compuestos y la posible descomposición térmica ($T=285^{\circ}\text{C}$) de los grupos nitro y amino introducidos a la muestra; por lo cual, se realizó otro análisis con un programa cromatográfico de menor temperatura ($T=270^{\circ}\text{C}$) para obtener una mayor resolución.

La eficiencia del nuevo programa de temperatura empleado si bien, permitió alcanzar el objetivo principal de separación de los picos de los diferentes congéneres y obtener gran cantidad de información acerca de las masas en estudio, no es del todo adecuada para obtener la determinación completa de todos los compuestos en la mezcla ya que éstos, incluyen diferentes isómeros por congénere, lo que dificulta su identificación.

La identificación de los congéneres aminados con el nuevo programa de temperatura, se ha presentado especialmente difícil al tratarse de varias series de isómeros y tampoco no ha sido posible referirlos, debido a la inexistencia de registros antecedentes de cromatografía. Se ha podido constatar, que la resolución disminuye a medida que aumenta el peso molecular de los compuestos a separar en la mezcla; por lo cual, se ha requerido de la aplicación de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para comprobar las posiciones nitradas y aminadas en la estructura molecular de los diferentes congéneres. Con esta técnica, la posición y número de grupos introducidos es inequívoca.

Los valores obtenidos en el estudio, concuerdan bastante bien con los valores de las masas. A pesar de ello, para evitar errores en la cuantificación de cada uno de los congéneres nitrados y aminados se decidió realizar la determinación de una manera indirecta; es decir, mediante la cuantificación de los isómeros de BPCs que aparcan en los cromatogramas de los BPCs nitrados y aminados que no fue posible que se nitraran ni aminaran; debido a que las posiciones adecuadas estaban ocupadas o presentaban impedimentos estéricos. Las figuras XIV-14 y XIV-15 presentan los cromatogramas de los análisis realizados a los BPCs nitrados y aminados respectivamente.

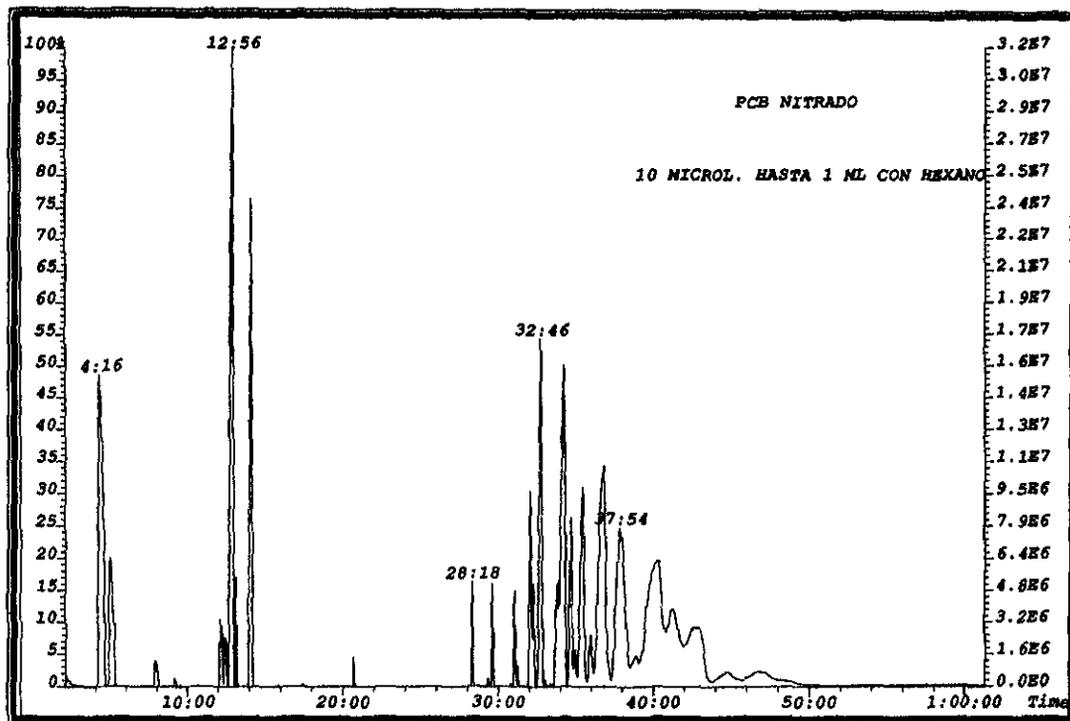


Fig. No. XIV-14.- Análisis cromatográfico de los BPCs nitrados

Como se observa, los isómeros 53, 99, 117, 169, 141, 186, 187, 182, 196, 194, 200, 198 y 195 presentes en el BPC puro se nitraron (Tabla XIV-11). El octaclorobifenilo 197 es un nuevo isómero formado por dechloración. Los congéneres 100, 136, 129 y 181 no se nitraron debido a que las posiciones adecuadas están ocupadas o presentan impedimentos estéricos, como se muestra en la Tabla XIV-12.

Isómero	Nombre	Número IUPAC	Masa (m/z)
2,2',5,6	Tetraclorobifenilo	53	292
2,2',4,4',5	Pentaclorobifenilo	99	326
2,3,4',5,6	Pentaclorobifenilo	117	326
3,3',4,4',5,5'	Hexaclorobifenilo	169	360
2,2',3,4,5,5'	Hexaclorobifenilo	141	360
2,2',3,4,5,6,6'	Heptaclorobifenilo	186	394
2,2',3,4',5,5',6	Heptaclorobifenilo	187	394
2,2',3,4,4',5,6'	Heptaclorobifenilo	182	394
2,2',3,3',4,4',5,6'	Octaclorobifenilo	196	430
2,2',3,3',4,4',5,5'	Octaclorobifenilo	194	430
2,2',3,3',4,5',6,6'	Octaclorobifenilo	200	430
2,2',3,3',4,5,5',6	Octaclorobifenilo	198	430
2,2',3,3',4,4',5,6	Octaclorobifenilo	195	430

Tabla No. XIV-11.- Congéneres nitrados

Isómero	No. IUPAC	Congénere	Masa (m/z)
2,2',4,4',6	100	Pentacloro bifenilo	326
2,2',3,3',6,6'	136	Hexacloro bifenilo	360
2,2',3,3',4,4'	129	Hexacloro bifenilo	360
2,2',3,4,4',5,6	181	Heptacloro bifenilo	394

2,2',3,3',4,4',6,6'	197	Octacloro bifenilo	430
---------------------	-----	--------------------	-----

Tabla No. XIV-12.- Congéneres que no se nitraron y producto de deoloración (en gris)

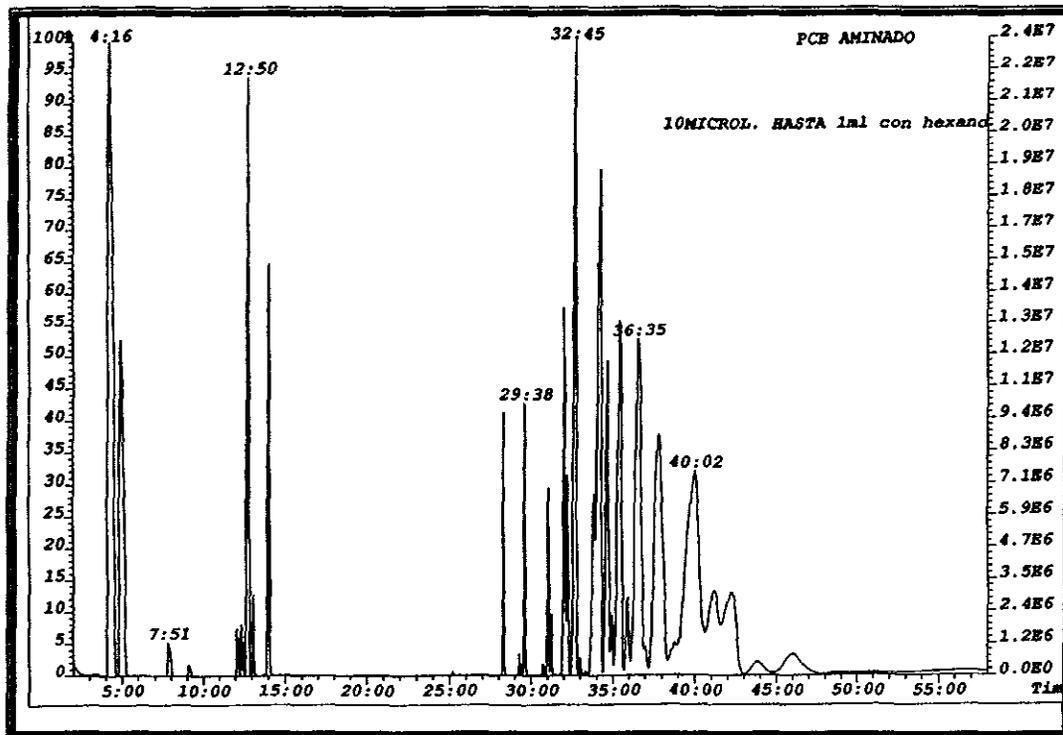


Fig. No. XIV-15.- Análisis cromatográfico de los BPCs aminados

Los valores detectados en el análisis de espectrometría de masas de los BPCs aminados y sus respectivos espectros se encuentran en la tabla XIV-13 y figuras XIV-16 a la XIV-18.

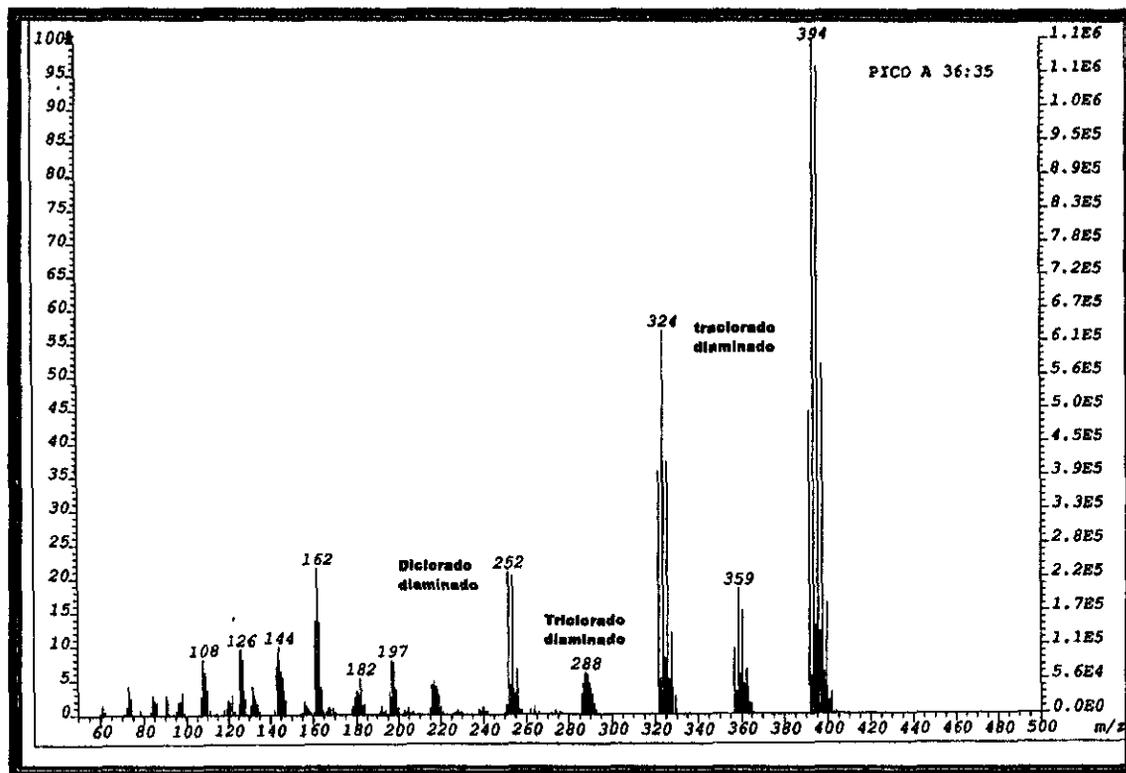


Fig. No.XIV-16.- Espectros de masas de los bifenilos mono, di, tri y tetraclorados diaminados

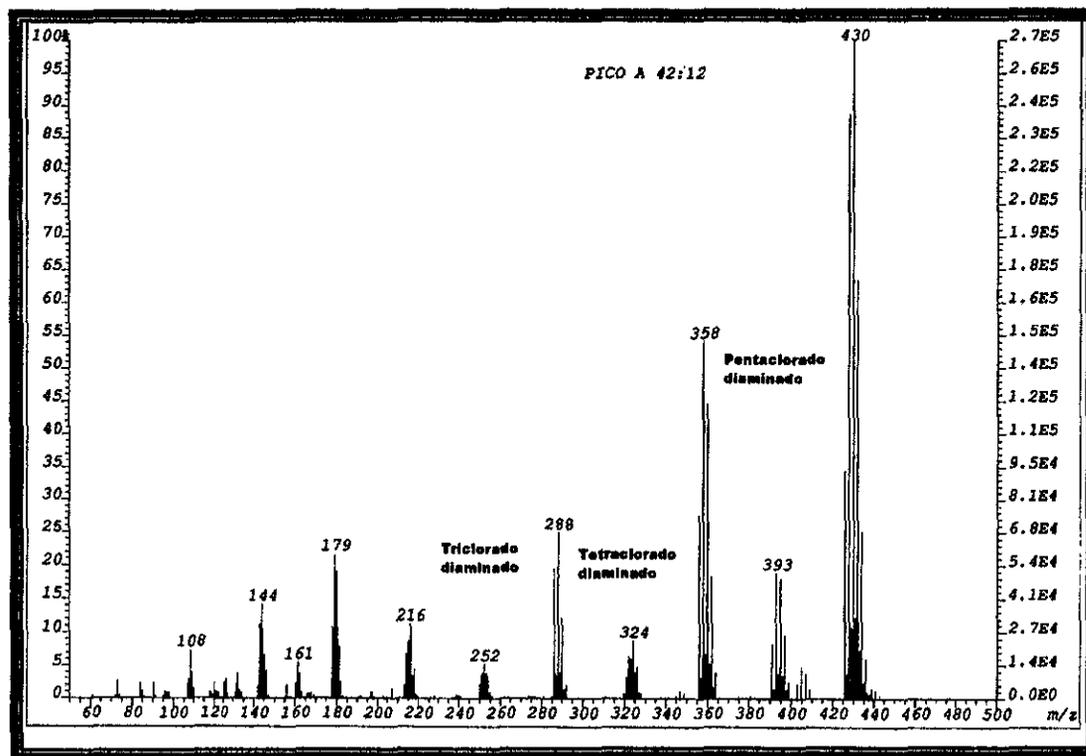


Fig. No.XIV-17.- Espectros de masas de los bifenilos tri, tetra y penta clorados diaminados

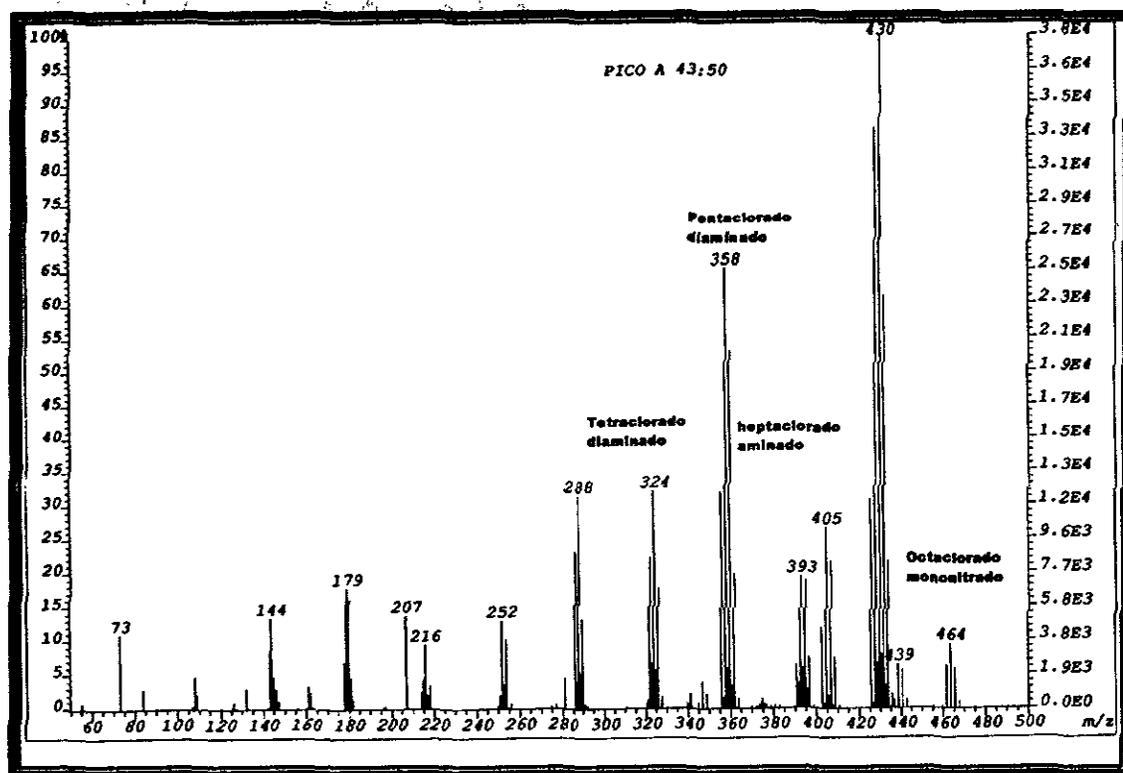


Fig. No. XIV-18. - Espectros de masas de los bifenilos penta, hexa y heptaclorado mononitrados

Número de masa detectada	Congénere correspondiente
218	Bifenilo monoclorado diaminado
252	Bifenilo diclorado diaminado
288	Bifenilo triclorado diaminado
324	Bifenilo tetraclorado diaminado
358	Bifenilo pentaclorado diaminado
392	Bifenilo hexaclorado diaminado
373	Bifenilo pentaclorado mononitrado
405	Bifenilo hexaclorado mononitrado
439	Bifenilo heptaclorado mononitrado

Tabla No. XIV-13. - Valores de masas de los BPCs aminados determinadas por espectrometría de masas.

En la tabla XIV-14 se presenta el resultado del análisis de los BPCs aminados. La tabla XIV-15 presenta los congéneres 100, 129, 181, 194 y 195 que no se aminaron ya que son los mismos isómeros que no se nitraron.

Isómero	No. IUPAC	Congénere	Masa (m/z)
2,2',4,4',6,6'	155	Hexaclorobifenilo	360
2,2',4,4',5,5'	153	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,4,4',5	137	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,4',5',6	149	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,3',5,6'	135	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,4,5,5',6	185	Heptaclorobifenilo	394

Tabla No. XIV-14. - Análisis cualitativo de los bifenilos policlorados aminados

Isómero	No. IUPAC	Congénere	Masa (m/z)
2,2',4,4',6	100	Pentaclorobifenilo	326
2,2',3,3',4,4'	129	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,3',6,6'	136	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,4,4',5,6	181	Heptaclorobifenilo	394
2,2',3,3',4,4',5,5'	194	Octaclorobifenilo	430
2,2',3,3',4,4',5,6	195	Octaclorobifenilo	430

Tabla No. XIV-15.- Congéneres que no se aminoraron

En la tabla XIV-16, se presentan los isómeros 135, 137, 149, 153, 155, 185 y 197 formados por la deoloración de las moléculas del BPC con los grupos nitro introducidos que vezabilizan los átomos de cloro adyacentes; la eliminación de cloros se efectuó probablemente durante la reacción con hidrazina.

Isómero	No. IUPAC	Congénere	Masa (m/z)
2,2',4,4',6,6'	155	Hexaclorobifenilo	360
2,2',4,4',5,5'	153	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,4,4',5	137	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,4',5',6	149	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,3',5,6'	135	Hexaclorobifenilo	360
2,2',3,4,5,5',6	185	Heptaclorobifenilo	394
2,2',3,3',4,4',6,6'	197	Octaclorobifenilo	430

Tabla No. XIV-16.- Congéneres formados como productos de deoloración.

En general, los resultados obtenidos representan nuevas áreas interés teórico para realizar trabajos de investigación no sólo en la búsqueda de las técnicas cromatografías más adecuadas, sino por la utilidad de los datos obtenidos para el propio proceso de biodegradación. Por otra parte, se puede considerar que los resultados de este pretratamiento químico son nuevos reportes y registros CAS para publicación.

Los resultados obtenidos de los análisis cromatográficos y de resonancia magnética nuclear, permiten confirmar los estudios de Kuhn y Suflika (1989^a) en lo que respecta a la eliminación de electrones de las estructuras aromáticas resonantes por la introducción de los grupos nitro en la molécula, haciendo al anillo más susceptible al ataque nucleofílico, particularmente en las posiciones *orto* y *para*. Lo cual, contribuye a la eliminación preferencial de los halógenos de estas posiciones.

14.5. Determinación de Resonancia Magnética Nuclear de BPCs puros

Por este método se ha podido confirmar la existencia de bifenilos policlorados en la muestra analizada, (figuras XIV-19 y XIV-20). En los espectros de ¹H y ¹³C aparecen las señales características para estos compuestos. Por comparación de los espectros obtenidos con los estándares de la bibliografía se puede deducir que la mezcla de BPCs extraída del aceite es similar a la del Aroclor[®] 1260.

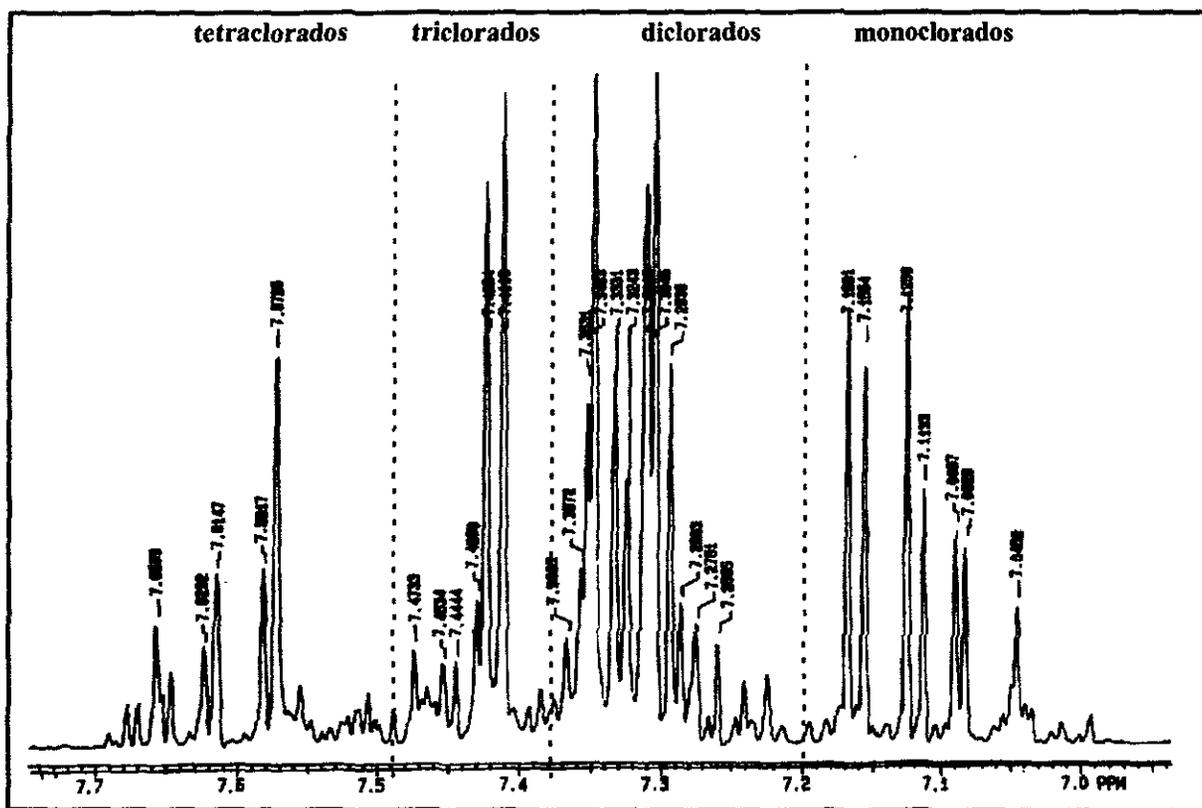
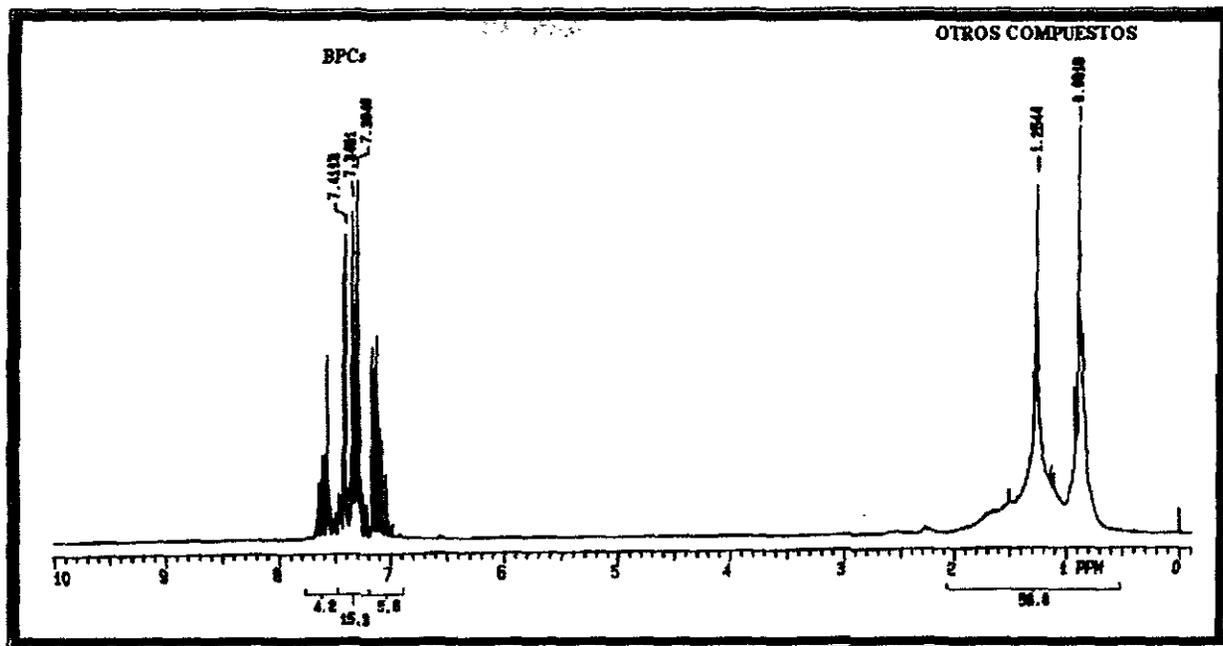


Fig. No. XIV-19.-Análisis de RMN por ^1H para la muestra de BPC puro.

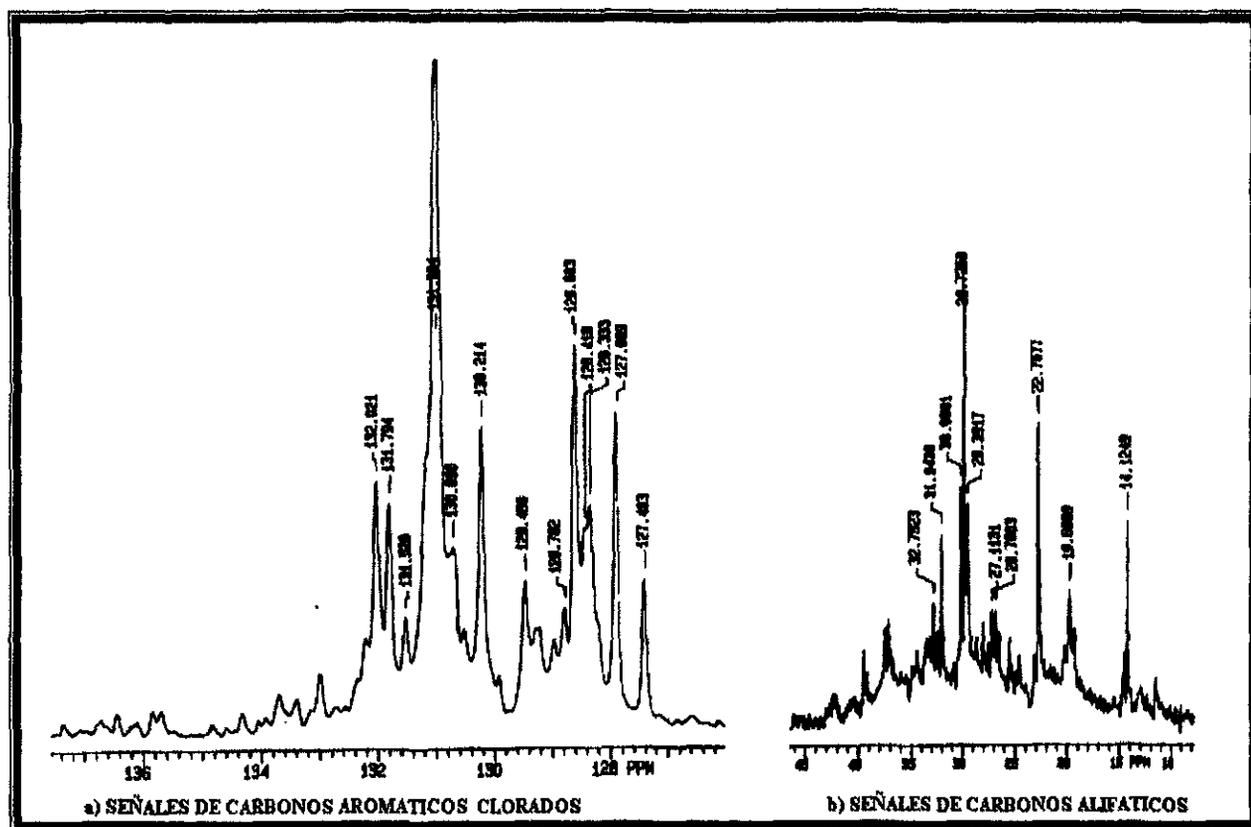
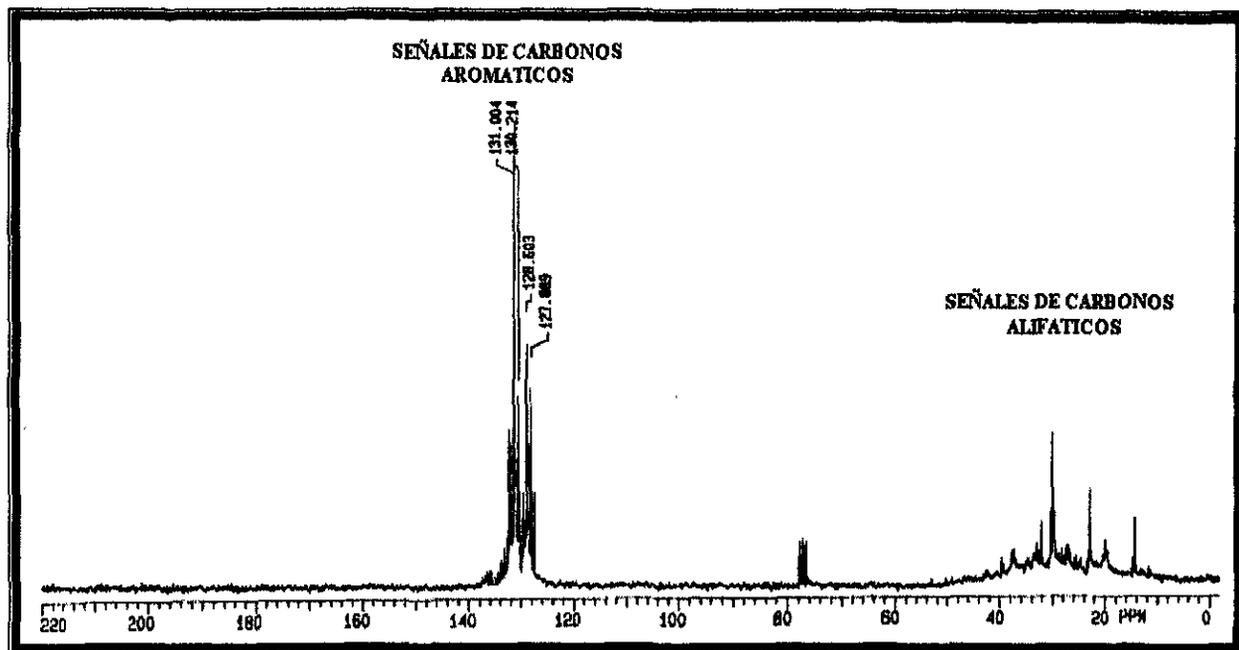
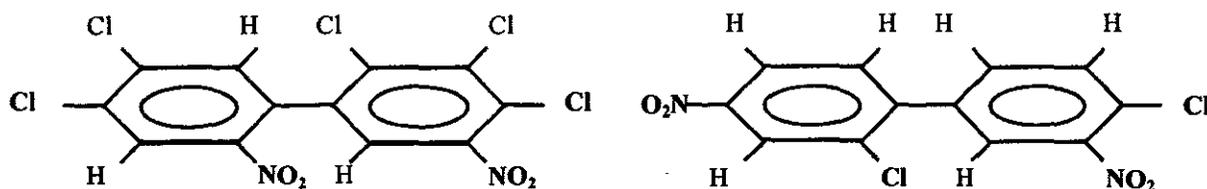


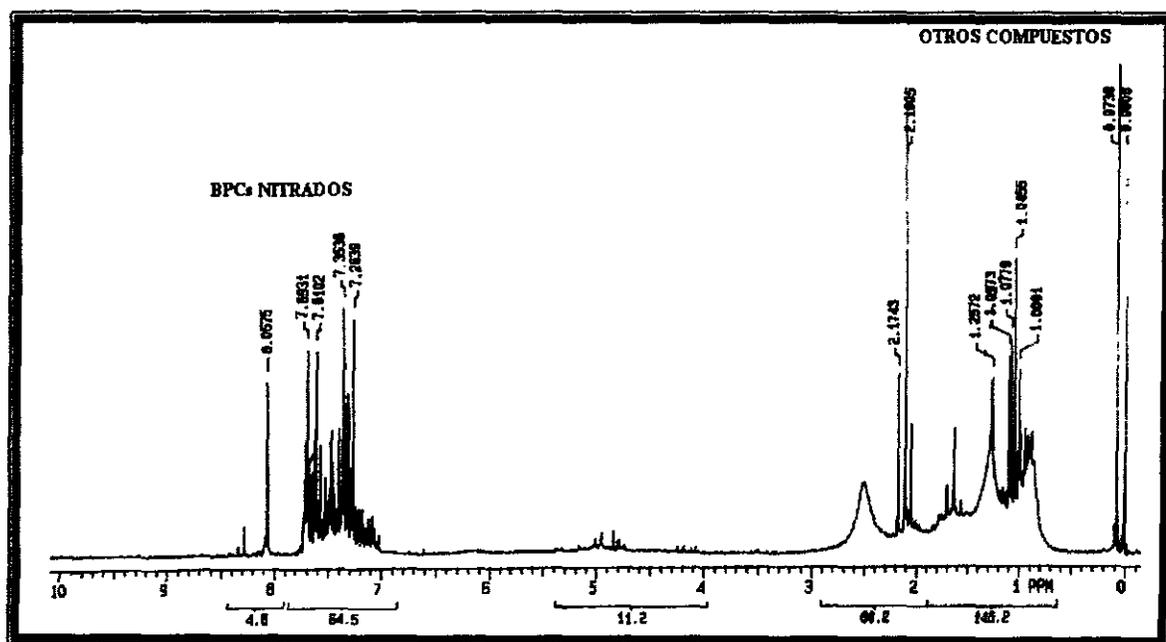
Fig. No. XIV-20.- Análisis de RMN por ¹³C para la muestra de BPC puro.

14.6. Determinación de Resonancia Magnética Nuclear de BPCs nitrados

Los resultados del análisis de Resonancia Magnética Nuclear del ^1H y ^{13}C han determinado la existencia de bifenilos policlorados nitrados. En el espectro, existen aparecen las señales características de los BPCs, pero al realizar la comparación con las figuras de la muestra de BPCs puros, se observan claras diferencias entre las señales, por lo que se deduce que la existencia de compuestos nitrados con la introducción preferente de los grupos nitro en las posiciones *para* y *orto* de la molécula del clorobifenilo. Sin embargo, existen aunque en muy pequeña proporción sustituciones en *meta*. Los análisis de la relación de áreas del ^1H (figura XIV-21) demuestran la existencia de compuestos dinitrados de la forma:



En la cual, existen 3 H vecinos por átomo de cloro, y 1 H vecino por grupo nitro. La relación de áreas del ^{13}C (figura XIV-22) señala la existencia de un átomo de carbono sustituido por un grupo nitro por cada átomo de carbono sustituido con cloro.



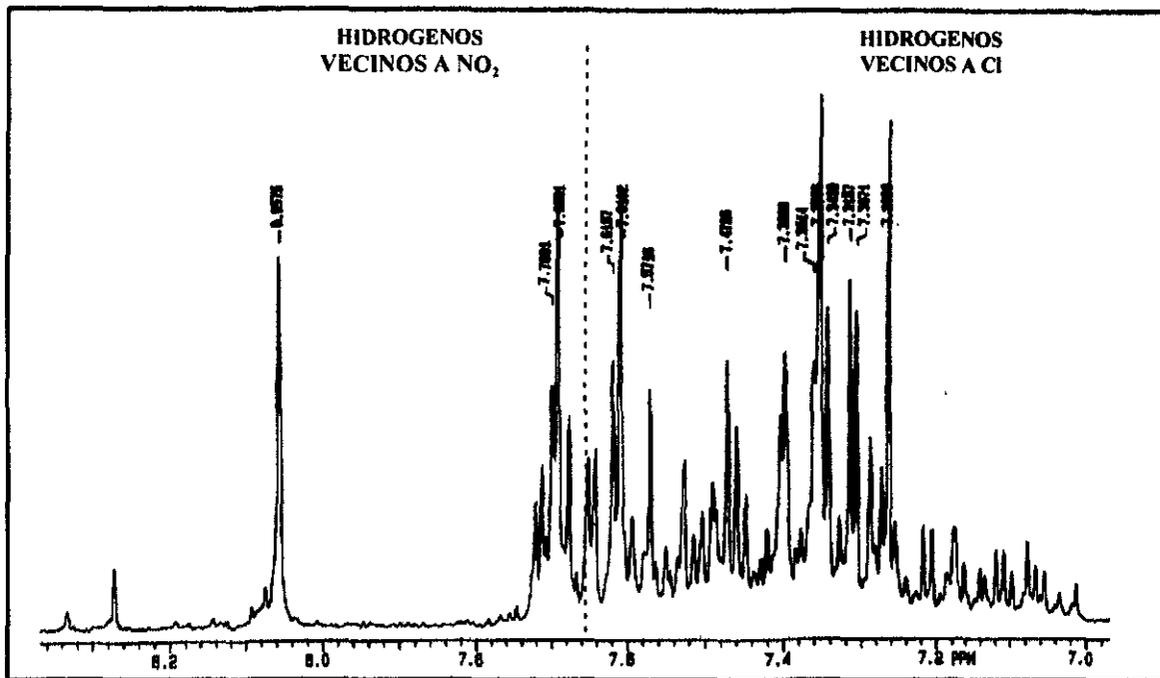
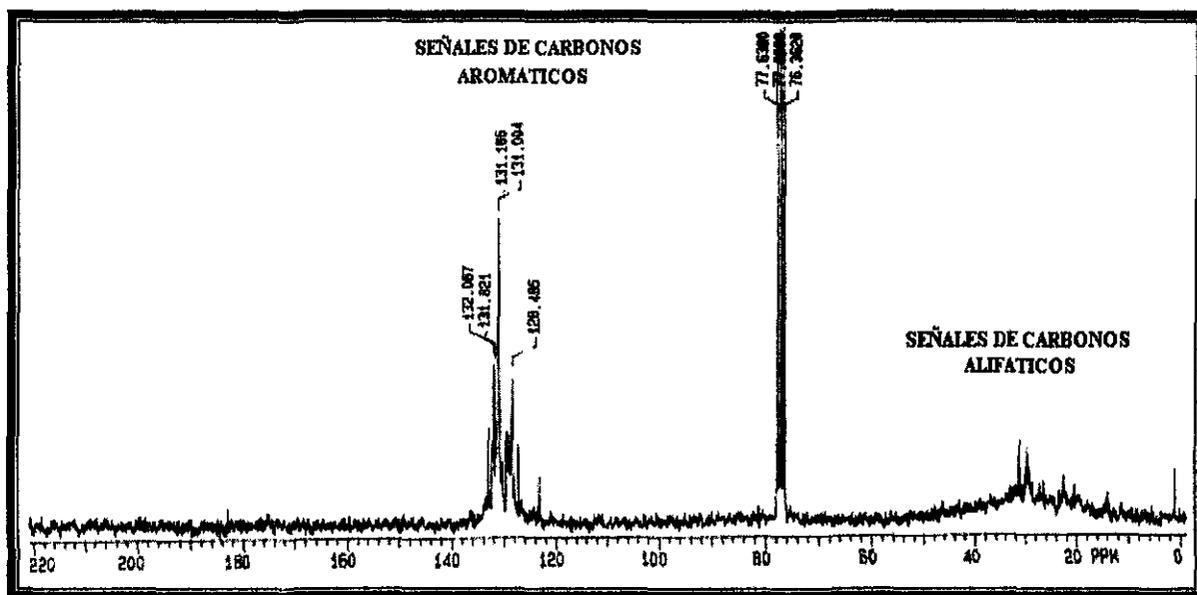


Fig. No. XIV-21.- Análisis de RMN por ^1H para la muestra de BPCs nitrados.



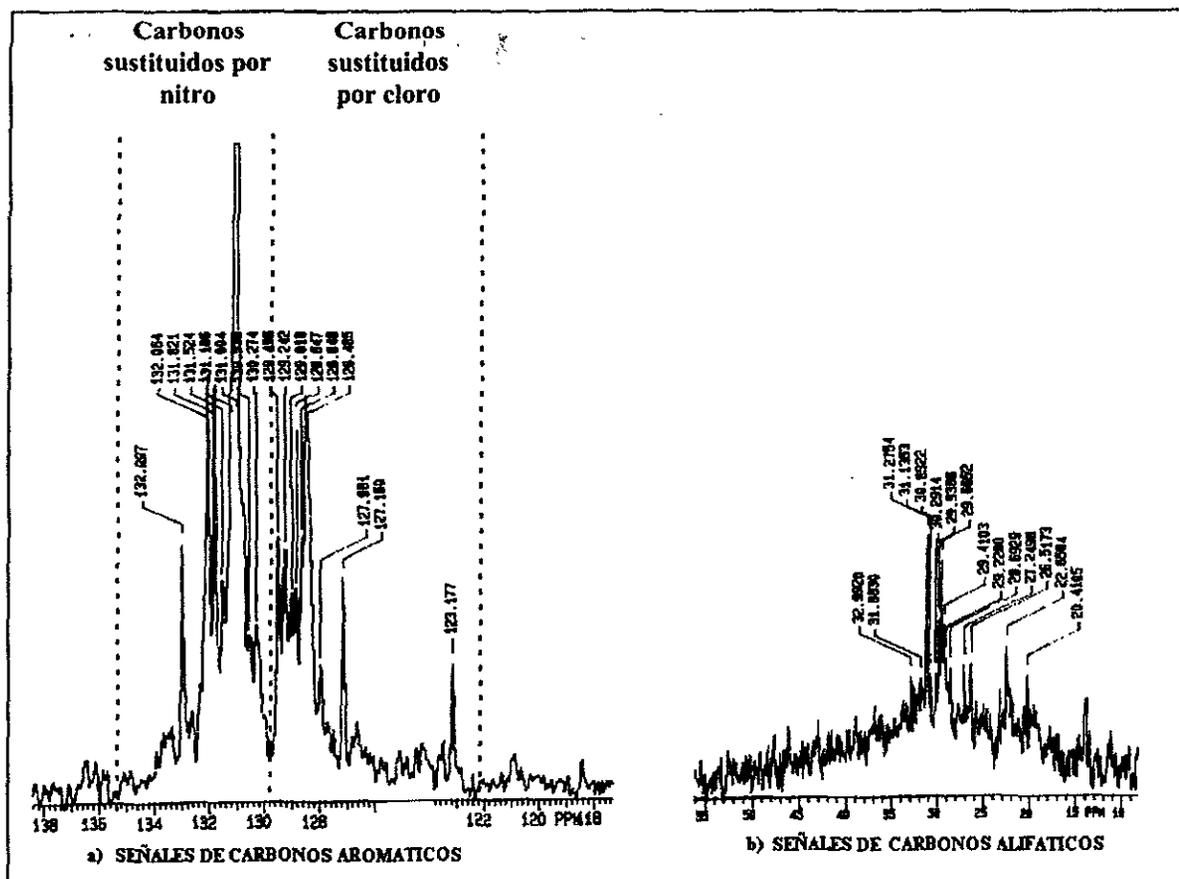


Fig. No. XIV-22.- Análisis de RMN por ^{13}C para la muestra de BPCs nitrados.

14.7. RENDIMIENTO DEL PROCESO DE NITRACIÓN Y AMINACIÓN DE LOS BPCs EXTRAÍDOS DE LOS ACEITES DIELECTRICOS

El mayor porcentaje de bifenilos policlorados corresponde a los congéneres, tetra, penta, hexa y heptaclorados los cuales, en su mayoría se han dinitrado; existe además, una cantidad significativa de congéneres heptaclorados mononitrados y solo una pequeña cantidad de congéneres octaclorados que no fueron nitrados debido probablemente a que todas sus posiciones *orto* y *para* se encuentran ocupadas por átomos de cloro, o bien se encuentran estéricamente impedidas.

Los resultados generales del análisis comparativo de la cuantificación de los BPC puro, nitrado y aminado se muestran en la figura XIV-23; como se puede apreciar, el rendimiento del tratamiento de nitración es muy satisfactorio llegando al 100% para los tetracloro bifenilos presentes en la muestra, 86% para los pentaclorados, 64% para los hexaclorados y 53% para los heptaclorados.

En general, los rendimientos de la reducción con hidrazina de los BPC nitrados es ligeramente menor, a excepción de los tetraclorobifenilos que presentan un porcentaje similar al del tetracloronitrobifenilo.

Rendimiento de tratamiento químico

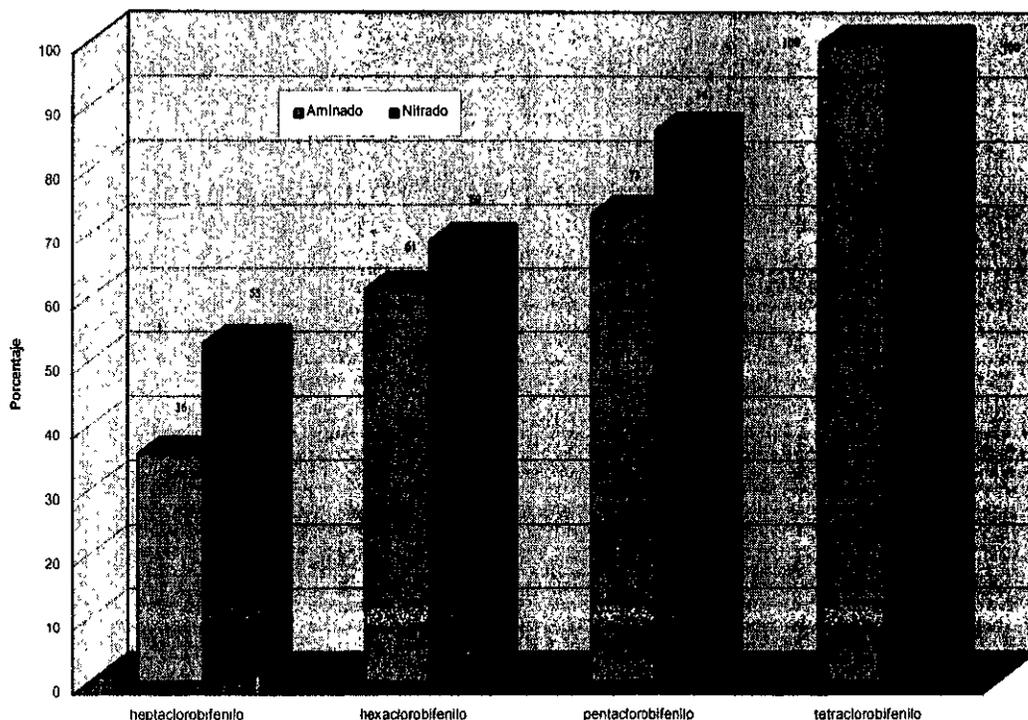


Fig. No. XIV-23.- Rendimiento del tratamiento de nitración y aminación de los BPCs

No ha sido posible realizar la cuantificación de los octaclorobifenilos, aunque se encuentran presentes ya que ha sido imposible realizar la recta de calibrado debido a que se requería de una concentración mayor a 10 ppm de la que existe en la solución patrón y debido además a que por debajo de esta concentración, la respuesta de este tipo de congénere es apenas perceptible por el detector de masas. Los detalles de la cuantificación obtenidos de la espectrometría de masas se encuentra en la figura XIV-24.

La distribución de los diferentes congénere obtenidos del proceso de nitración y aminación es diferente de la obtenidas en la determinación de los BPCs puros, lo que pone de manifiesto la influencia labilizadora de los grupos nitro y amino sobre las moléculas de cloro vecinas.

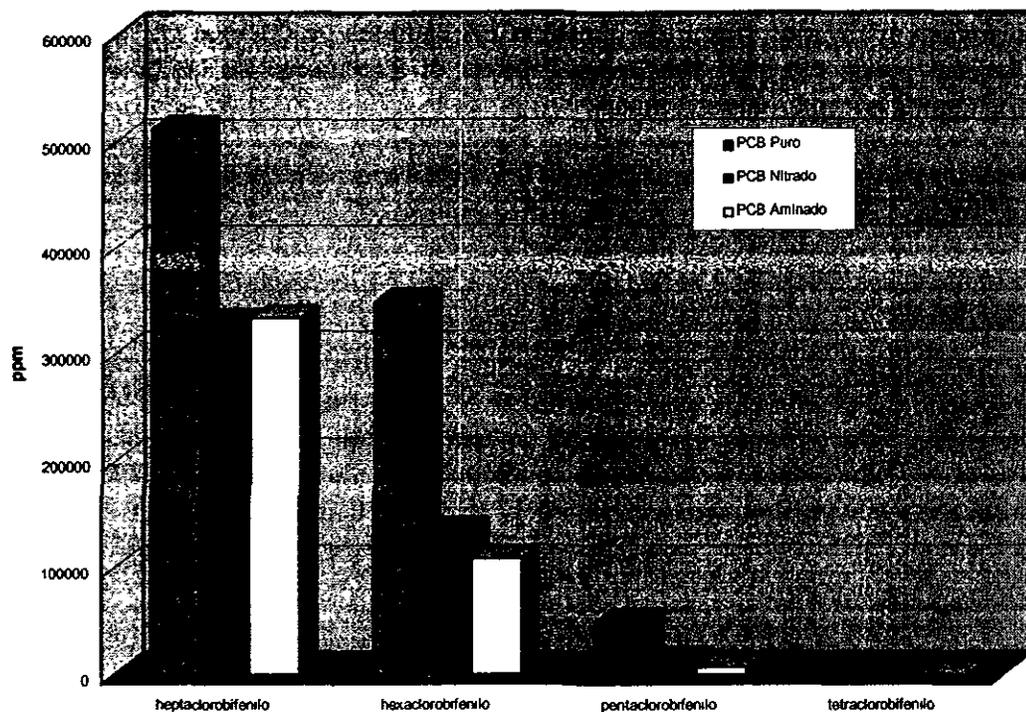


Fig. No. XIV-24.- Detalles de la cuantificación de los BPCs puros, nitrados y aminados.

Como se puede observar, existe un problema de cuantificación en los congéneres de heptaclorobifenilos aminados ya que superan el valor de los heptaclorobifenilos nitrados con un error inferior al 2%. El problema fue debido a errores de instrumentación analítica en el momento en que el equipo de computo realizó la integración de áreas.

14.8. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS BPCs NITRADOS

Consecuentemente a la fase de investigación anterior, se ha originado un nuevo tema de tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental en la Universidad Nacional Autónoma de México basada en la caracterización de los nuevos BPCs nitrados obtenidos en el pretratamiento químico.

Muchas de las transformaciones fisicoquímicas que sufren los BCPs al ser aminados, se pueden seguir mediante técnicas de análisis específicos. El interés en la realización de estas técnicas radica, en que permite recoger datos cualitativos muy poco asequibles por otro tipo de métodos. Para ello, ha sido preciso realizar la caracterización que definiese bien las moléculas de los compuestos así formados. Sin embargo, la falta de información y referencias al respecto, ha producido incertidumbre en el análisis de los datos en algunos casos.

La caracterización fisicoquímica de estos compuestos, representa una gran ayuda en el análisis de las relaciones entre la estructura química de los nuevos BPCs nitrados y el

comportamiento cromatográfico de sus diferentes congéneres, ya que permite deducir los parámetros estructurales a partir de los tiempos de retención y viceversa.

La caracterización fisicoquímica se centró en las transformaciones estructurales y modificaciones de sus propiedades durante el tratamiento químico de nitración de las moléculas de BPCs. Los análisis realizados, permiten constatar los cambios producidos en su estructura y propiedades, lo cual puede servir de base para explicar el incremento de las posibilidades de degradación enzimática por microorganismos.

14.8.1. ANÁLISIS TÉRMICO

Análisis en Picnómetro

El análisis se realizó en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México utilizando un picnómetro, para determinar el comportamiento que experimentan los BPCs nitrados (tabla XIV-17) ante los cambios de temperatura, en un rango de temperatura ambiente (T_a) y hasta 380 °C bajo las siguientes condiciones de operación: $T_a = 20^\circ\text{C}$, $V = \text{Veloc. de calentamiento} = 4$ y $P = \text{Presión Atmosférica} = 0.77 \text{ atm}$ en la Ciudad de México.

Tabla No. XIV-17.-Cambios por temperatura de la muestra de BPCs nitrados*.

Temperatura:	Cambio observado:
150 °C	Inicio de burbujeo inconstante, con pequeñas burbujas en diferentes rangos de temperatura hasta alcanzar los 200 °C.
200 °C	Inicio de un cambio apreciable en la coloración, la muestra comienza a tornarse rojiza.
250 °C	El color de la muestra es casi negra, pero aún se aprecia algo de líquido.
280 °C	No se distingue líquido y la muestra está prácticamente carbonizada.

* Realizados con incrementos constantes de temperatura.

Posteriormente, realizando un cambio en la velocidad de calentamiento, se observa un incremento en la intensidad y tamaño del burbujeo a temperaturas más bajas que las observadas anteriormente (a 140 °C aprox.) los cambios de coloración se llevan a cabo a la misma temperatura observada. Sin embargo, cuando se realiza el mismo proceso a una menor velocidad de calentamiento no se observa burbujeo, pero persiste el cambio de color en el mismo rango de temperaturas observadas en los dos procedimientos anteriores. La figura XIV-25 presenta los cambios de coloración del BPC puro, nitrado y aminado.

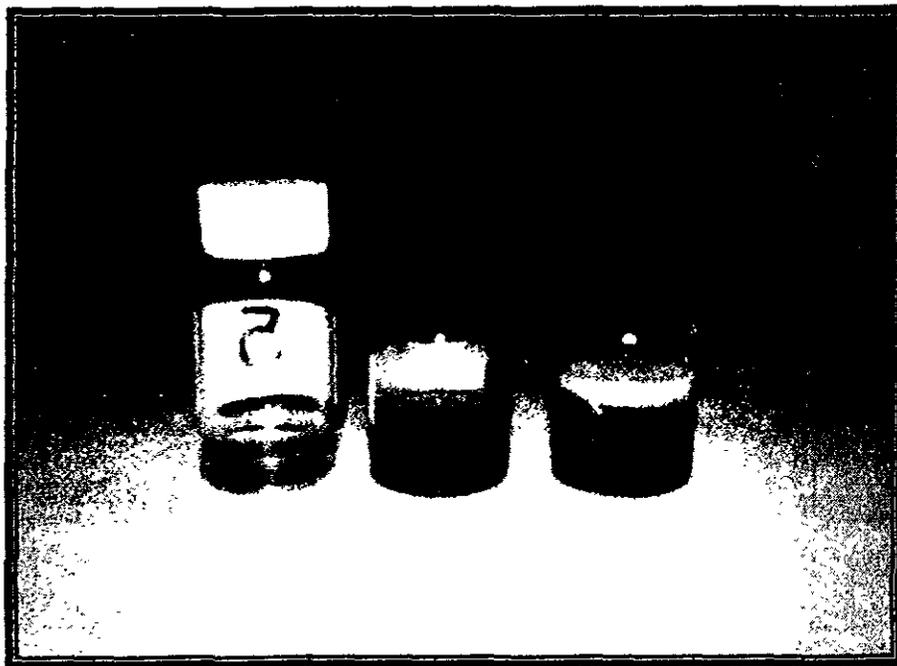


Fig. No. XIV-25 .- Cambio de coloración del BPC puro, nitrado y aaminado (izquierda a derecha)

14.8.2. ANALISIS POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL

Los resultados de los análisis realizados con el Analizador Calorimétrico Diferencial (DSC) se resumen en la tabla XIV-18 y las figuras XIV-26 y XIV.27.

Tabla No. XIV-18 .-Cambios experimentados por las muestras analizadas.

Muestra	Rango de fusión	Rango de ebullición (°C)
BPCs puros	-51 a -30 -30 a 10	180 a 225
BPCs nitrados	34 a 56	125 a 195 195 a 230

- El análisis de las temperaturas de fusión de las muestras de BPCs puros, presentan dos zonas de temperatura en donde se llevan a cabo los cambios, comprendidas entre -51 a -30°C y otra entre -30°C a 10°C ; por referencia de los análisis realizados de RMN y CG/EM se tiene conocimiento que la muestra presenta impurezas por lo que se deduce que los rangos de temperatura más bajos corresponden a las impurezas.
- La temperatura de ebullición se inicia a temperaturas superiores a los 225°C .
- La muestra de BPC nitrado presentan un rango de temperatura de fusión desde 34°C a 56°C .

- En la zona de altas temperaturas, existen dos zonas con un rango de vaporización entre 125 °C a 195 °C que pertenecen a las impurezas y otra de 195 °C a 230 °C la de los BPCs nitrados.

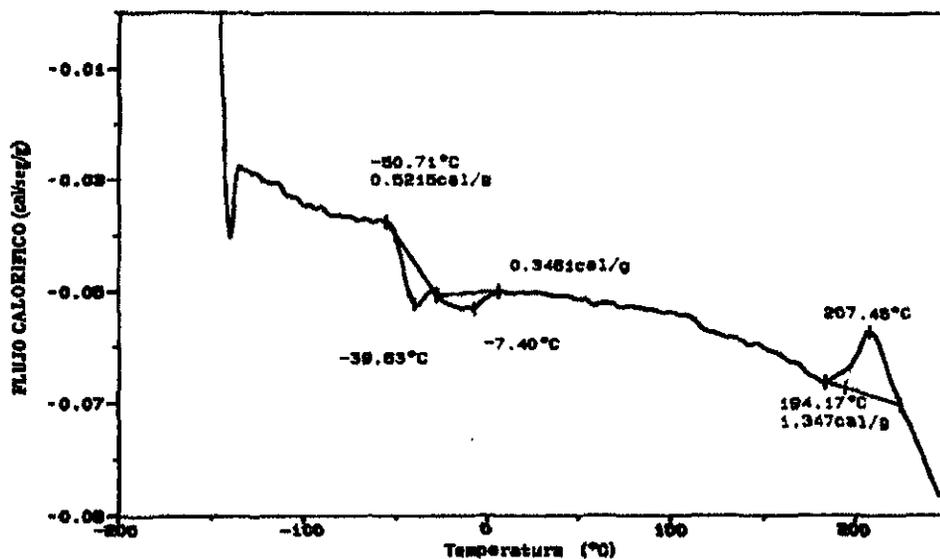


Fig. No. XIV-26 .- Análisis Calorimétrico Diferencial de la muestra de BPC puro, Atmosfera inerte de N_2 y velocidad de calentamiento 10 °C/min.

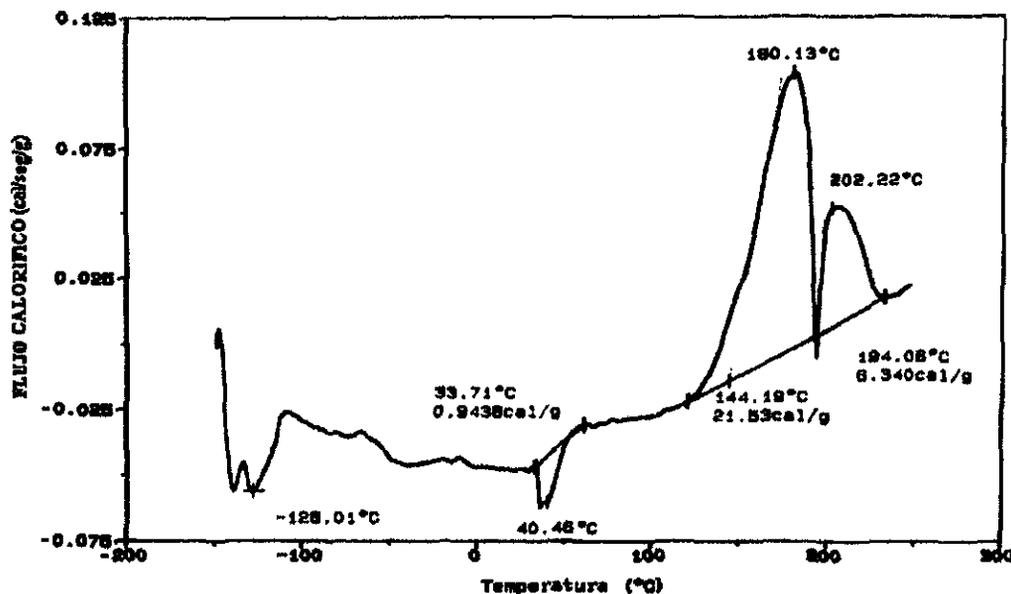


Fig. No. XIV-27 .- Análisis Calorimétrico Diferencial de la muestra de BPC nitrado, Atmosfera inerte de N_2 y velocidad de calentamiento 10 °C/min.

14.9. DETERMINACIÓN DE ECOTOXICIDAD

Los resultados de las pruebas de ecotoxicidad, realizadas por el método de bioensayo de luminiscencia a los BPCs puros, nitrados y aminados antes de introducirlos en los reactores, se presenta en la tabla XIV-19. Como se observa, el valor de EC_{50} de BPC aminado supera casi dos veces el valor límite inferior, por lo que el BPC aminado puede considerarse como no ecotóxico para este tipo de bioensayo.

El BPC nitrado es el que presenta la mayor toxicidad. Por otra parte, la sensibilidad del procedimiento de análisis para el BPC puro, no es del todo confiable, ya que este compuesto no presenta la misma solubilidad en agua que los otros dos para conseguir las condiciones requeridas por el método.

Tabla No. XIV-19.- Valores obtenidos de los análisis de ecotoxicidad

Muestra	EC_{50} (% v/v)	EC_{50} (mg/l)	EC_{50} límite (mg/l)/3.000*
BPC aminado	0,594	5,943.8	1,981
BPC nitrado	0,003	34.3	0,011
BPC puro	1,327	13,274	4,424

*Cociente EC_{50} / límite: número de veces que la EC_{50} de la muestra supera el valor 3.000 mg/l considerado como límite para definir el carácter ecotóxico de una sustancia. (BOE/270/1989).

⁽¹⁾ H = mayor que el estándar más alto.

14.10. PRUEBAS DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZANDO BPC AMINADO COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO

El crecimiento efectivo de los microorganismos a expensas del BPC aminado como única fuente de carbono y nitrógeno, fue determinado midiendo la absorbancia a 660 y 386 nm en el medio mineral que contiene la suspensión de microorganismos. Los valores alcanzados fueron 0,743 y 1,163 respectivamente, medidos al tercer día a 20 °C y con un pH=7. El amarilleamiento del medio, es el resultado de la transformación de los BPCs aminados y representa la acumulación de compuestos formados por la biodegradación como se observa en la figura XIV-28.

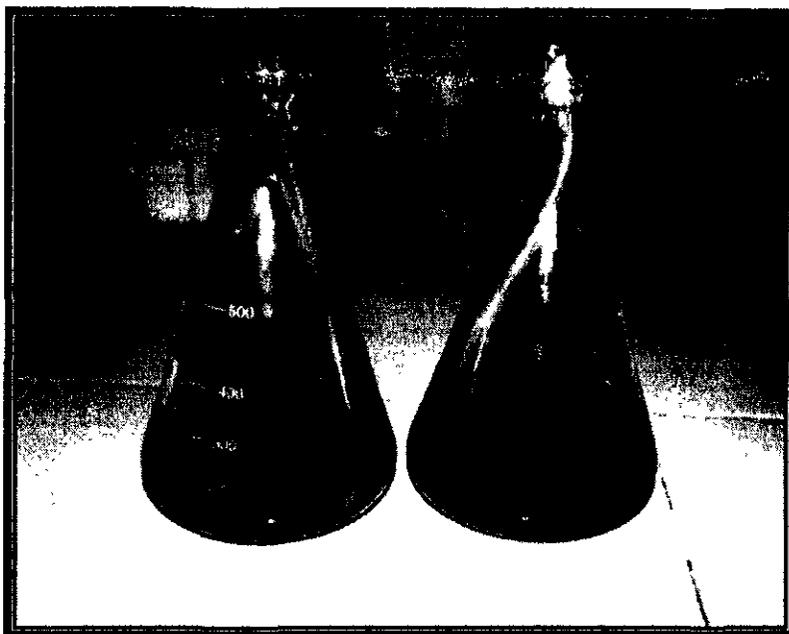


Fig. No. XIV-28.- Amarilleamiento del medio como prueba de la biodegradación del BPC aminado.

14.11. ANALISIS DEL TRATAMIENTO AEROBIO EN LOS BIOENSAYOS

Los bioensayos aerobios, realizados para la degradación de los BPCs aminados en matraces a nivel laboratorio, han demostrado que durante el proceso de biodegradación, los radicales formados por el grupo amino pueden ser sustituidos por grupos hidroxilos; incluso los radicales nitro son fácilmente sustituibles por los grupos hidroxilos. Durante esta reacción de sustitución, se pueden labilizar ciertos átomos de cloro. Los dos tipos de sustituyentes (amino e hidroxilos) representan lugares específicos del ataque a la molécula para las enzimas producidas por los microorganismos; sin embargo, para que se lleve a cabo la asimilación celular, es necesario la adición de micronutrientes al sistema; además de la extracción de los metabolitos generados para evitar la inhibición del proceso de biodegradación.

La biodegradación del BPC aminado, puede involucrar una intrincada red de compuestos intermedios más que una simple vía; lo que puede hacer la determinación de la ruta y secuencia de biodegradación completa un tanto difícil.

Los resultados preliminares de los bioensayos, muestran indicios de buenos resultados; pero ha sido necesario seguir afinando detalles de las reacciones de biodegradación en los reactores aerobio y anaerobio.

Por el momento, el análisis cromatográfico de los metabolitos obtenidos de la biodegradación en los ensayos utilizando cepas puras del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, mezclas de hongos, mezclas de bacterias y mezclas conjuntas de todos los microorganismos, han demostrado la presencia de diferentes compuestos formados por la ruptura de al menos uno de los anillos del bifenilo.

El proceso de biodegradación, incluye una serie de reacciones enzimáticas de fragmentación de la molécula del BPC aminado, lo que da origen a gran variedad de compuestos cuya concentración se incrementa y decrece conforme transcurre el período de tratamiento en el sistema. Algunos de estos compuestos, experimentan posteriormente un reagrupamiento por reacciones radicalarias dando origen a hidrocarburos de cadena larga entre los que comúnmente se encuentran compuestos decanos; el problema se complica, cuando se producen formas extremadamente complejas como los tridecanos, tetracontanos y hexatriacontanos, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Sin embargo, toda esta serie de compuestos son biodegradados en el mismo reactor.

14.11.1. Bioensayo con mezcla de bacterias

Las tablas XIV-20 a la XIV-22 presenta los principales compuestos formados de la biodegradación del BPC aminado en el bioensayo utilizando la mezcla de bacterias y sus respectivos tiempos de retención. Las figuras XIV-29 a la XIV-35 presentan los cromatogramas y gráficas correspondientes de los metabolitos generados en el bioensayo.

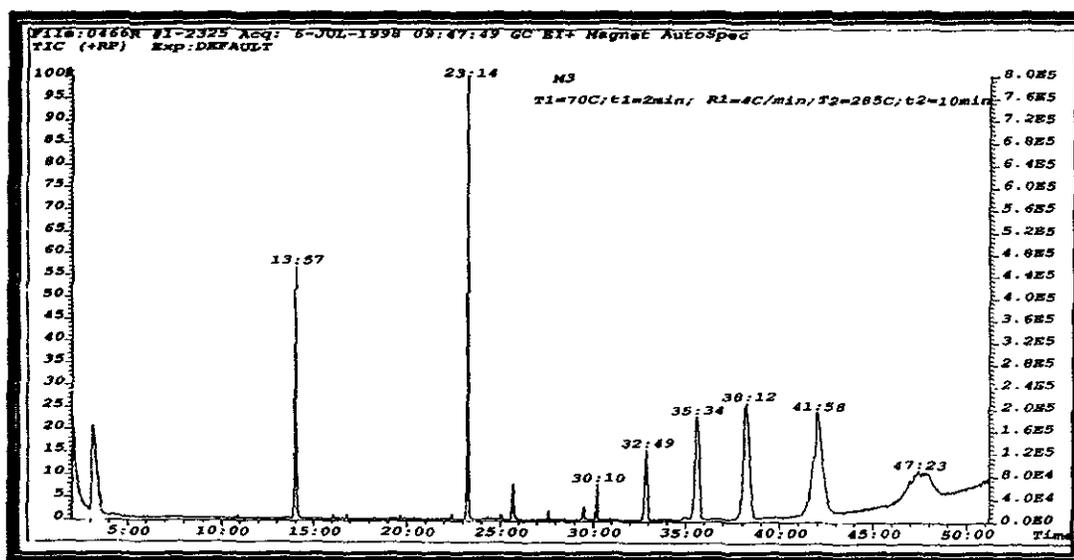


Fig. No. XIV-29.- Cromatograma de los metabolitos generados al 1º día en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias.

Tabla No. XIV-20.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias 1 día.

Metabolitos generados utilizando una mezcla de bacterias 1º día	
T. Retención	Compuestos
3:06	3,5,5 trimetil-2-ciclohexen-1-ona.
10:53	Decano
13:57	Ac. Fosforico tributil ester
16:05	Etilhexanol
16:49	Decano

19:39	Decano
22:25	Dodecano
23:14	Ac. Bencendicarboxílico bis (2-metilpropil) ester
24:21	Etilhexanol
24:32	Ac- 1,2, bencendicarboxílico bis (metoxietil) ester
25:04	2,6,8 trimetil-decano
25:40	Ac. Bencendicarboxílico bis (2-metoxi etil) ester
27:36	Dodecano
29:29	5 eicosene
30:10	Hexatriacontano
32:49	Hexatriacontano
34:57	1-hexacosanol
35:34	2,6,10,15 tetraetil -heptadecano
38:12	2,6,10,15 tetraetil-heptadecano
41:58	Octadecano
47:23	Heptadecano

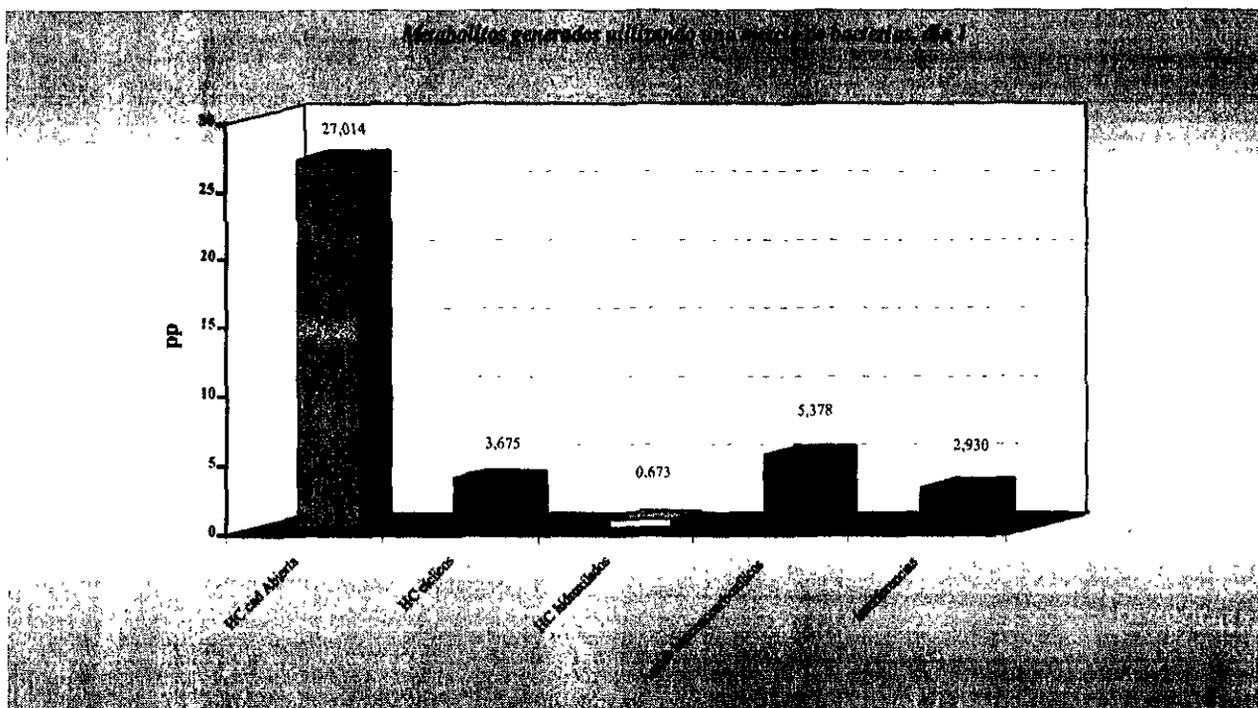


Fig. No. XIV-30.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias al 1° día

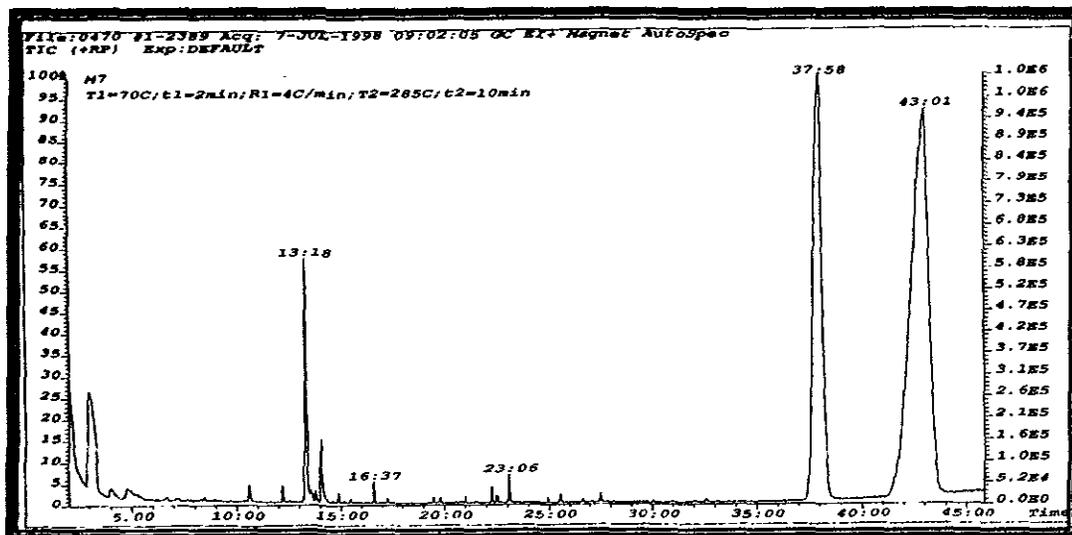


Fig. No. XIV-31 - Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias.

Tabla No. XIV-21.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias 3° día.

Metabolitos generados utilizando una mezcla de bacterias 3° día	
T. Retención	Compuestos
2:59	2-ciclohexen-1nona, 3,5,5 trimetil
4:04	1,2,4 tricloro benceno
10:37	Dodecano
12:12	1,2,3 tricloro-4-nitrobenceno
13:18	2,3,4 tricloroanilina
13:47	2(3H)-furanona 5-etil dihidro 5-metil (caprolactona)
14:02	2,3,4 tricloroanilina
14:53	Heptadecano
16:37	Hexadecano
19:29	Dodecano
19:49	Heptadecano
21:01	5,6-dimetil decano
21:16	4,5-dimetil nonano
22:30	Tetradecano
23:06	Ac. 1,2 bencendicabroxilico bis(2-metoxi etil) ester
24:56	3-etil-2-metil hexano
25:32	Ac. 1,2 bencendicabroxilico dodecil ester
26:40	Hexadecano
27:31	Hexatriacontano
32:36	Hexacosano
33:09	22', 34, 4'5 hexaclorobifenilo (hexa CB)
37:58	bis(2-etil hexil) ester -Ac. Hexadecanoico
43:01	bis(2-etil hexil) ester -Ac. 1,2 bencendicabroxilico

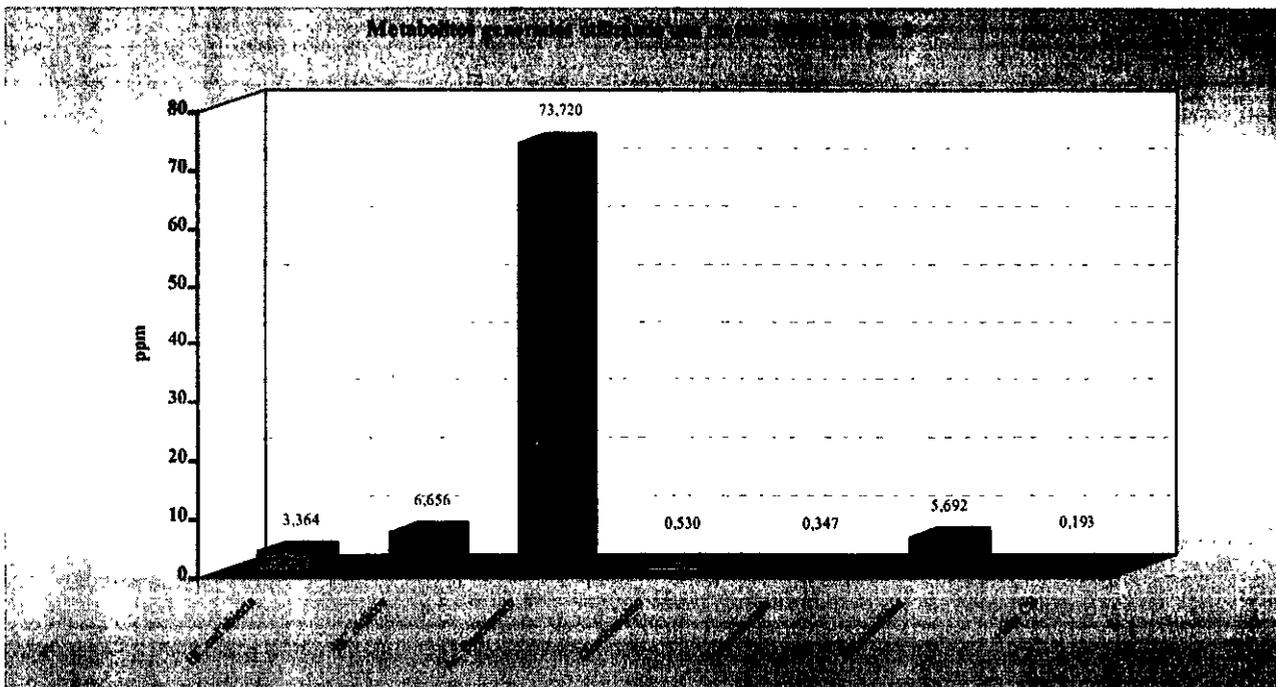


Fig. No. XIV-32.- Metabolitos generados del bioensayo utilizando una mezcla de bacterias 3° día.

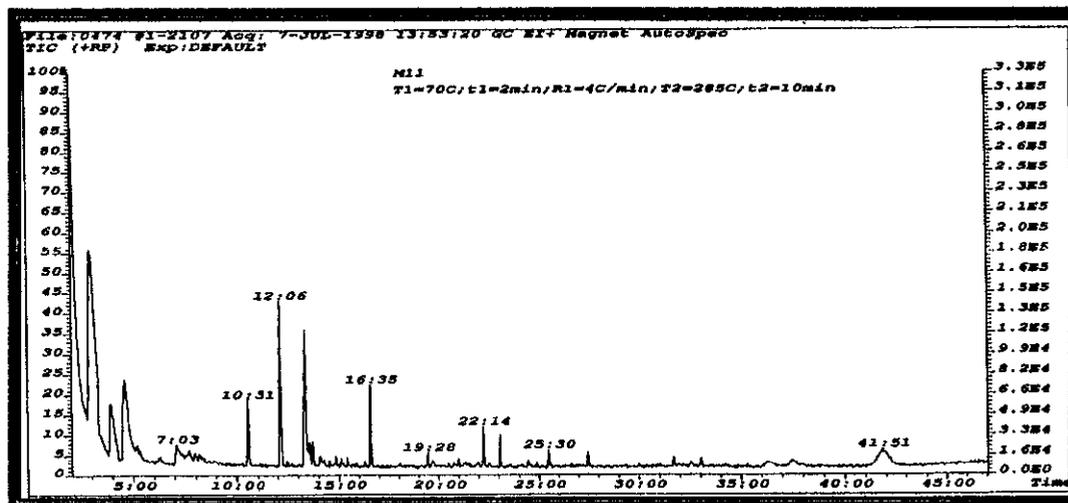


Fig. No. XIV-33.- Cromatograma de los metabolitos generados al 7° día en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias.

Tabla.No.XIV-22.- *Tiempos de retención y metabolitos generados en los bioensayos utilizando una mezcla de bacterias 7º día.*

Metabolitos generados utilizando una mezcla de bacterias 7º día.	
<i>T. Retención</i>	<i>Compuestos</i>
2:55	3,5,5 Trimetilciclohex-2-en-1-ona
3:55	1,2,4 triclorobenceno
4:36	Ac. Octanoico
10:31	Decano
12:06	1,2,3 tricloro- 4-nitrobenceno
13:20	1,3,5 tricloro-metoxibenceno
13:34	4-etil tetradecano
13:43	Ac. Fosforico tributil ester
14:04	ciclopentanona 2-(1-metil propil)
16:35	1,3,5 tricloro 2-metoxibenceno
19:28	5,6 dimetildecano
19:41	5,6 dimetildecano
20:58	5,6 dimetildecano
22:14	4,5-dimetil nonano
23:03	Ac. Bencendicarboxilico bis(4-metil propil) ester
24:26	heptano 2,3 dimetil
25:30	Ac. 1,2 bencendicarboxilico dodecil ester
27:29	ciclopentanona 2-(1-metil propil)
31:43	22', 34, 4'5'hexa CB
32:32	ciclopentanona 2-(1-metil propil)
33:00	22', 34, 4'5'hexa CB
36:21	ciclopentanona 2-(1-metil propil)
37:29	ciclopentanona 2-(1-metil propil)
41:51	Ac. Bencendicarboxilico dodecil ester

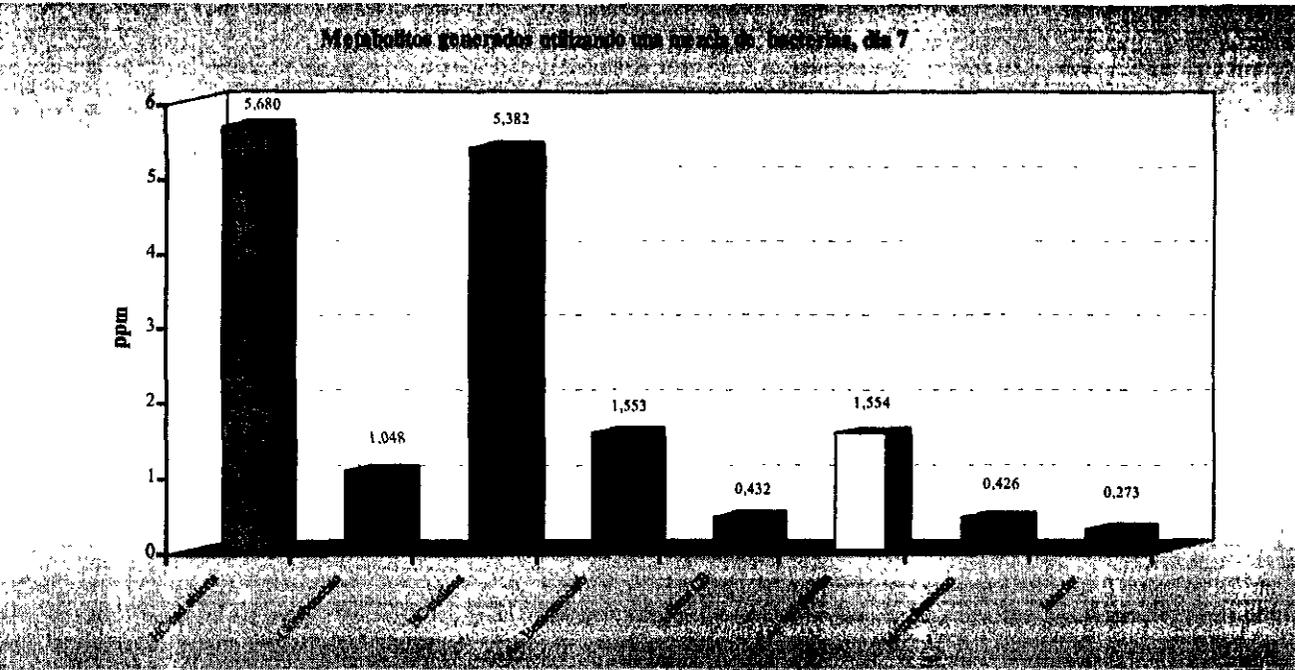


Fig. No. XIV-34.- Metabolitos generados del bioensayo utilizando una mezcla de bacterias 7° día

Metabolitos generados utilizando una mezcla de bacterias

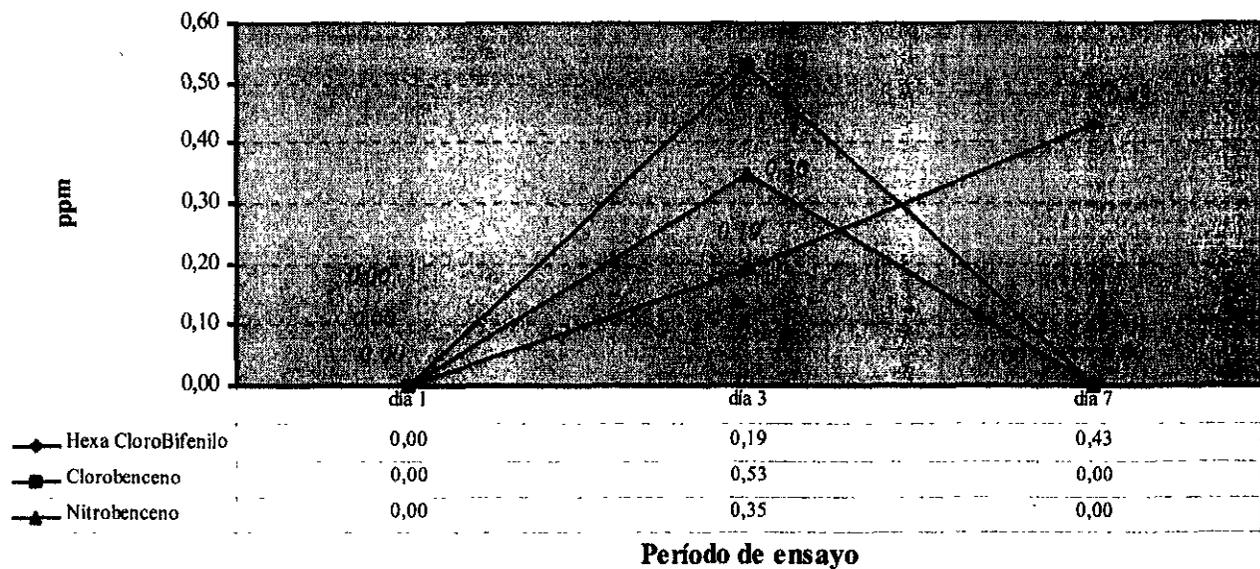


Fig. No. XIV-35.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de bacterias al 1°, 3° y 7° día

En el bioensayo utilizando la mezcla de bacterias, los compuestos cloro y nitrobenzenos son degradados completamente en un periodo de 7 días; sin embargo, los congéneres hexaclorobifenilos se acumulan conforme transcurre el periodo de tratamiento.

14.11.2. Bioensayo con *Phanerochaete chrysosporium*

Las tablas XIV-23 a la XIV-25 presenta los principales compuestos formados de la biodegradación del BPC aminado en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* y sus respectivos tiempos de retención. Las figuras XIV-36 a la XIV-42 presentan los cromatogramas y gráficas correspondientes de los metabolitos generados en el bioensayo.

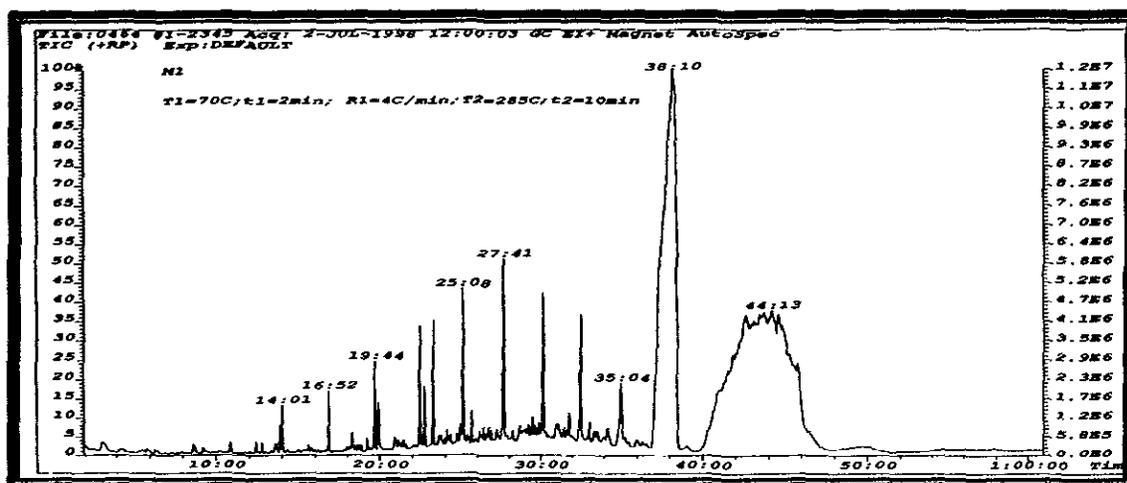


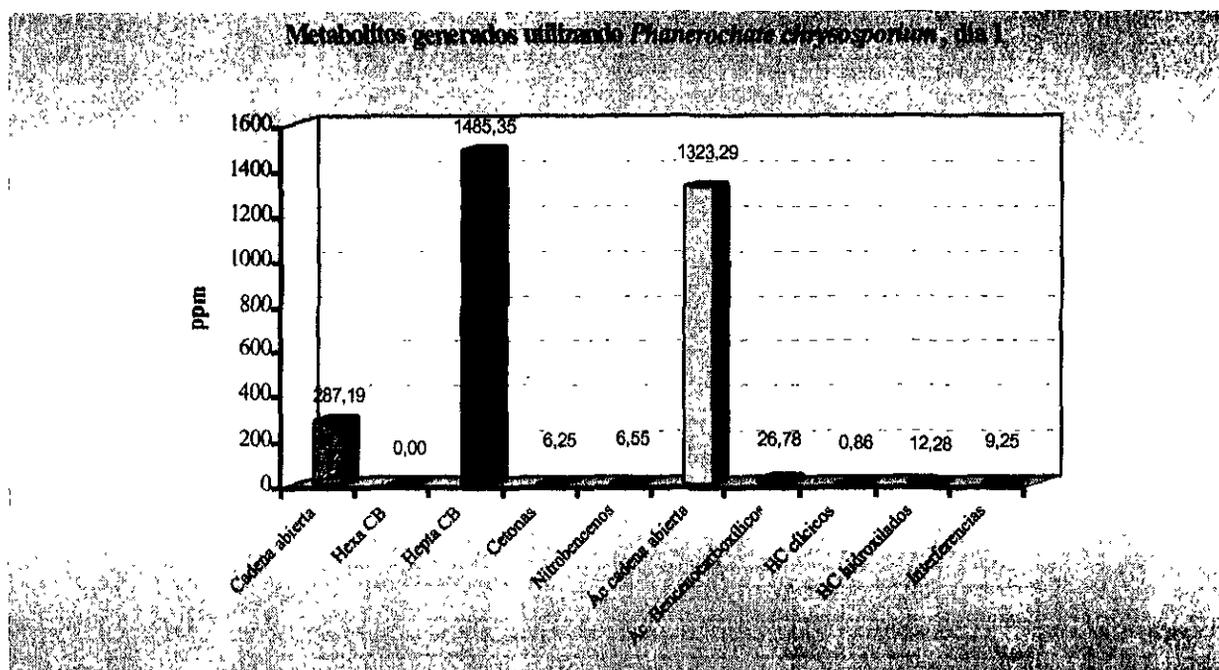
Fig. No. XIV-36.- Cromatograma de los metabolitos generados al 1° día en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium*

Tabla No. XIV-23.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* al 1° día.

Metabolitos generados utilizando <i>Phanaerochate chrysosporium</i> 1° día	
T. Retención	Compuesto
9:12	2-undecenal
10:53	Heptadecano
12:25	1,2,4-tricloro-5-nitrobenzeno
12:48	2,6,10,15-tetrametil-hepadecano
13:37	1,2,4-tricloro-5-nitrobenzeno
13:54	Heptadecano
14:01	Acido Fosfórico tributil éster
15:38	dietil ftalato
16:52	Hexadecano
18:01	4-ciclohexil-decano
18:19	Eicosano
18:52	Tridecano
19:15	2-dodecanona
19:44	Heptadecano
19:57	2,6,10,14-tetrametil-pentadecano

20:57	Acido decanodioico
21:28	3-metil-nonadecano
22:28	Octadecano
22:46	2,6,10,14-tetrametil-hexadecano
23:18	bis(2-metil propil)éster-Ac. 1,2 bencendicarboxilico
23:37	Tetratetracontano
23:45	Octadecanol
24:01	2,3-dimetil-heptadecano
24:09	2-metil-heptadecano
24:21	2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracosano
24:45	2-heptadecanona
24:59	Tritetracontano
25:08	Nonadecano
25:41	Butil 2-metilpropil éster- Ac.1,2 bencenodicarboxilico
26:26	13-octadecanal
27:17	Tritetracontano
27:41	Hexatriacontano
29:27	1-heptacosanol
30:09	Tetratetracontano
31:02	Tritetracontano
31:48	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
32:32	Pentatriacontano
33:05	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
33:32	3,3',4,4',5,5' hexa CB
34:15	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
35:04	Pentatriacontano
38:10	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
44:13	bis(2-metil propil) éster -Ac. Hexanodioico

Fig. No. XIV-37 .- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* 1° dia.



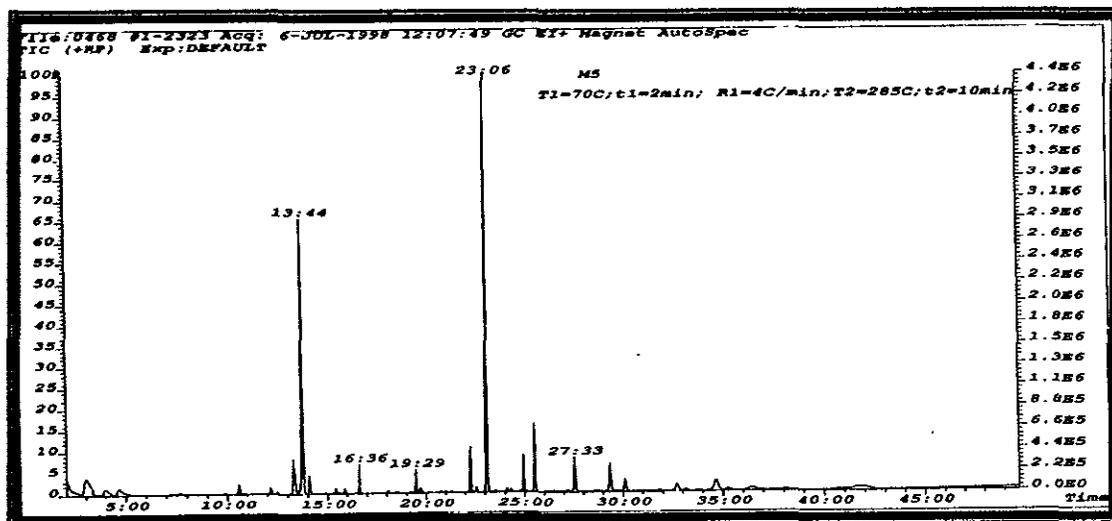


Fig. No. XIV-38.- Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium*

Tabla No. XIV-24.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* al 3 ° día.

Metabolitos generados utilizando <i>Phanerochaete chrysosporium</i> 3° día	
T. Retención	Compuestos
2:59	3,5,5-Trimetilciclohex-2-en-1-ona
3:59	1,3,5-triclorobenceno
4:40	Hexatriacontano
10:34	Hexatriacontano
12:09	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
12:30	Hexatriacontano
13:17	2,3,4-tricloroanilina
13:36	Hexatriacontano
13:44	Acido fosfórico tributil-éster
14:03	2,3,4-tricloroanilina
15:23	Dietil Ftalato
15:52	1-eteniloxi-decano
16:36	2,6,10,15-tetrametil-Heptadecano
19:29	2,6,10,15-tetrametil-Heptadecano
19:43	2,6,10,15-tetrametil-Heptadecano
22:16	Hexatriacontano
22:33	2,6,10,15-tetrametil-Heptadecano
23:06	bis(2-metil propil)ester- Acido 1,2-bencenodicarboxílico
24:05	5-octadecano
24:56	Hexatriacontano
25:31	bis(2-metoxietil) ester- Ac. 1,2 bencendicarboxílico
27:33	Hexatriacontano
29:21	5-Eicoseno

30:06	Hexatriacontano
31:49	2,2',3,4,4',5,-hexa CB
32:42	Hexatriacontano
33:09	2,2',3,4,4',5,-hexa CB
34:38	5-Eicoseno
35:15	2,2',3,3',4,4',5,6-hepta CB
36:23	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
38:06	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
40:38	5-Eicoseno
41:34	Acido 1,2-Benzenodicarboxílico, diisocetil éster

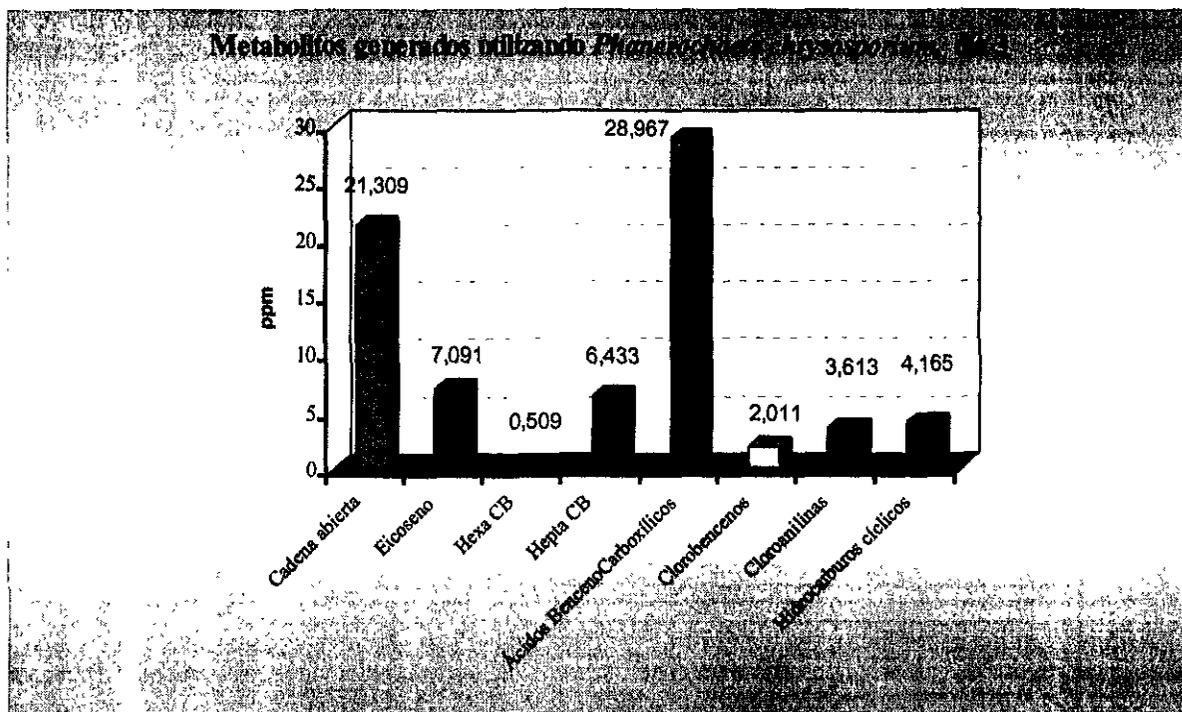


Fig. No. XIV-39.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* 3^o día

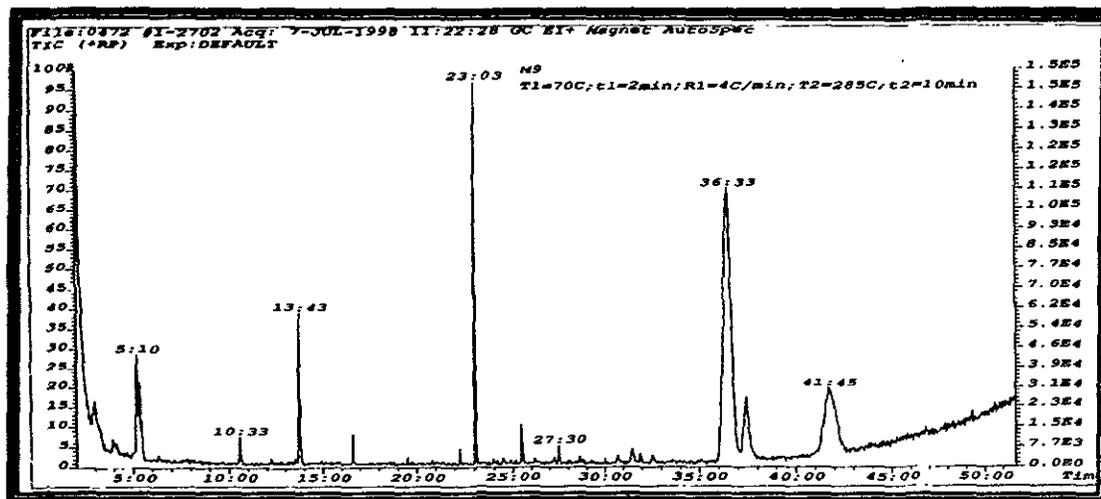


Fig. No. XIV-40.- Cromatograma de los metabolitos generados al 7° día en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium*

Tabla No. XIV-25.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* al 7 ° día.

Metabolitos generados utilizando <i>Phanaerochate chrysosporium</i> 7° día	
T. Retención	Compuestos
2,58	2,2'-dimetil-ciclohexanol
5,10	3,3,5-trimetil-1-hexeno
10,33	4,5-dimetil-nonano
13,43	Acido Fosfórico, tris(etilhexil) éster
16,35	5-metil-undecano
22,15	4,5-dimetil-nonano
23,03	bis(2-metoxietil) ftalato
25,30	bis(2-metoxietil) ftalato
27,30	ciclopentanona 2-sec-butil
31,30	1-etoxi-hexano
36,31	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
37,29	Acido hexanodioico, dioctil éster
41,45	bis(2-etilhexil) ftalato

Metabolitos generados utilizando *Phanerochaete chrysosporium* al 7° día

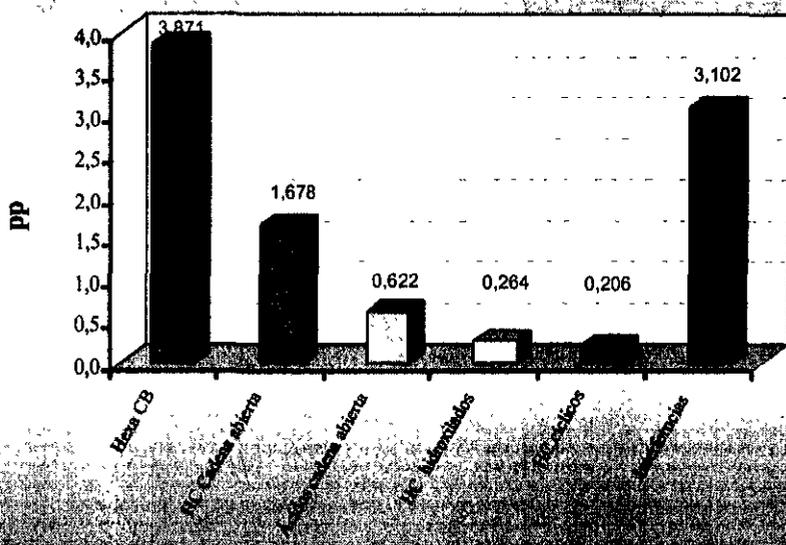


Fig. No. XIV-41.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* al 7° día

Metabolitos generados utilizando *Phanerochaete chrysosporium*

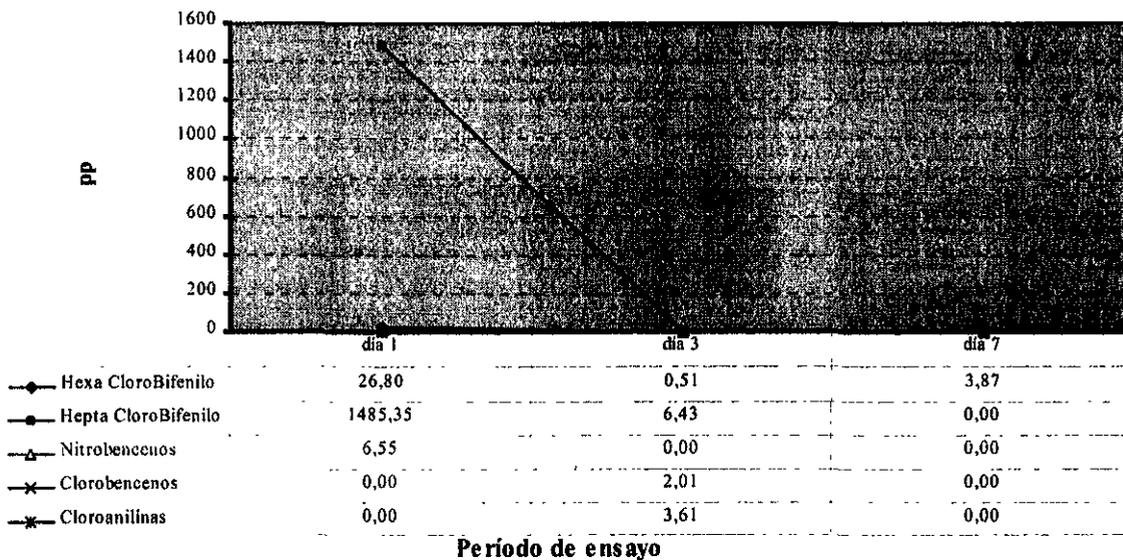


Fig. No. XIV-42.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando *Phanerochaete chrysosporium* 1°, 3° y 7° día

Como se observa, en el bioensayo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium* los compuestos clorobenceno, nitrobenzeno, cloroanilinas y los congéneres de heptaclorobifenilo son biodegradados completamente en un período de 7 días; sin embargo algunos congéneres de hexaclorobifenilos permanecen en el medio, aunque en pequeña proporción. Probablemente, éstos corresponden a los isómeros de difícil biodegradación.

14.11.3. Bioensayo con mezcla de hongos

Las tablas XIV-26 a la XIV-28 presenta los principales compuestos formados de la biodegradación del BPC aminado en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos y sus respectivos tiempos de retención. Las figuras XIV-43 a la XIV-49 presentan los cromatogramas y gráficas correspondientes de los metabolitos generados en el bioensayo.

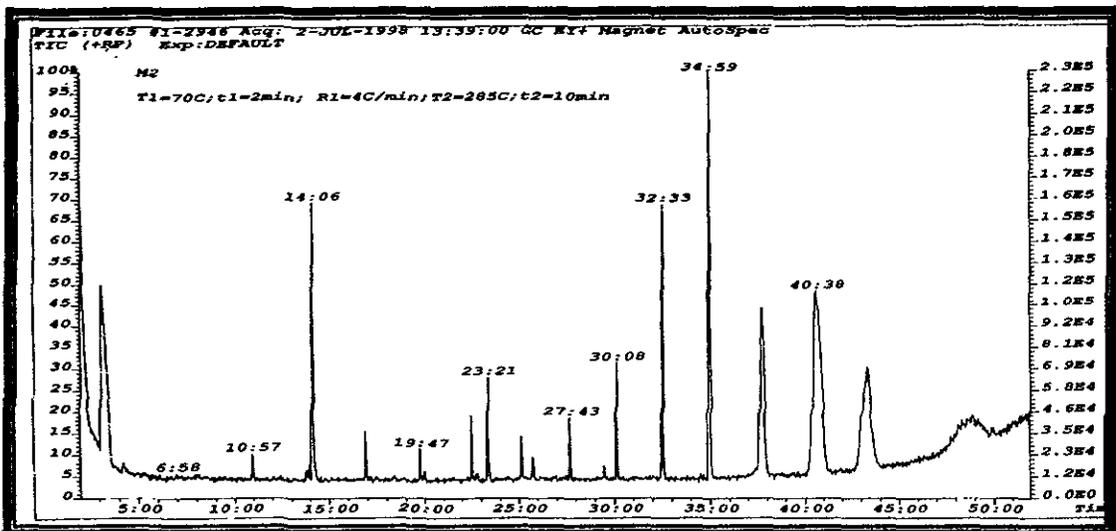


Fig. No.XIV-43.-Cromatograma de los metabolitos generados al 1° día en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos.

Tabla No.XIV-26.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos 1° día.

Metabolitos generados utilizando una mezcla de hongos 1° día	
T. Retención	Compuestos
3:09	3,5,5-Trimetil ciclohex-2-en-1-ona
10:57	Dodecano
14:06	Acido Fosfónico, tris (2-etilhexil) éster
16:55	Hexadecano
19:47	Hexacosano
22:31	Hexatriacontano
23:31	Acido 1,2-Bencenodicarboxílico, diheptil éster
25:10	Hexacosano
25:47	Bis(2-metoxietil) ftalato
27:43	Heptadecano

29:27	1-decanol, 2 metil
30:08	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
32:33	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
34:59	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
37:45	Hexatriacontano
40:38	Acido 1,2-Bencenodicarboxílico, ditridecil éster
43:19	Heptadecano
48:54	Hexadecano

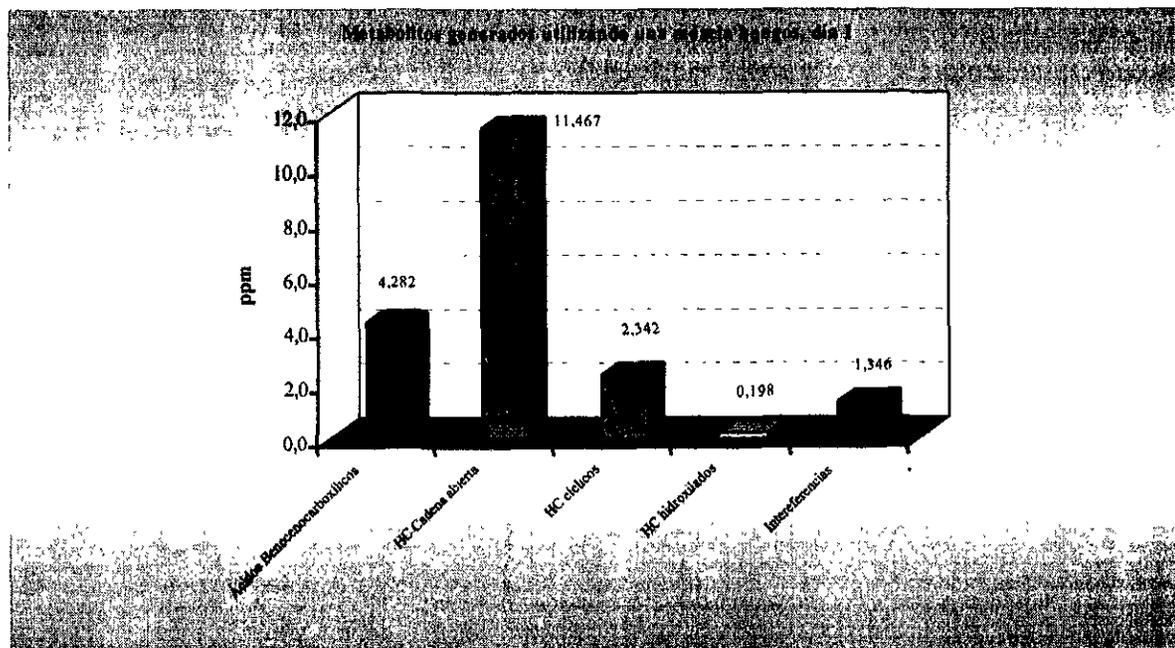


Fig. No.XIV-44.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos 1° día.

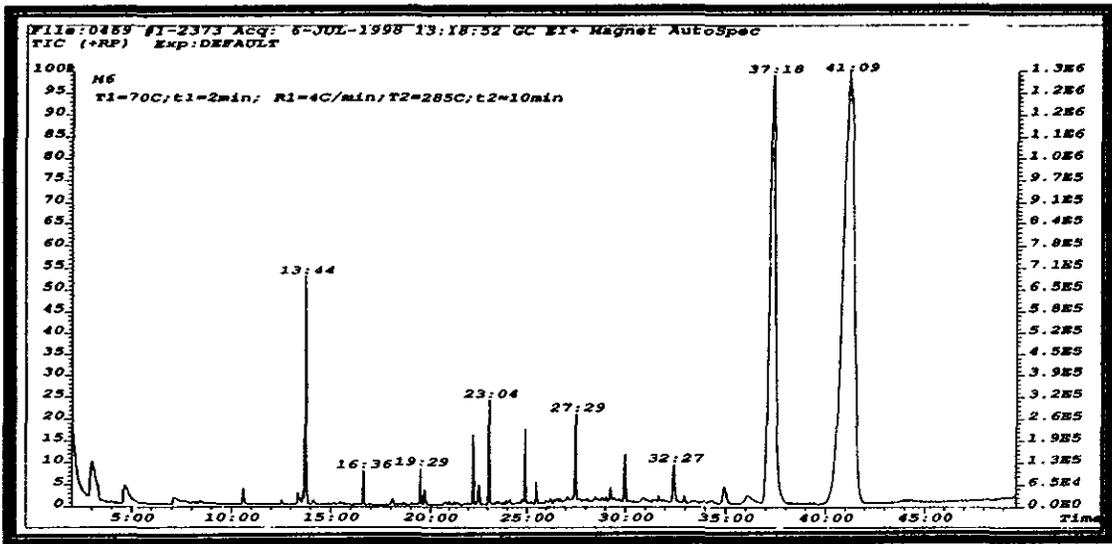


Fig. No.XIV-XIV-45.-Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos.

Tabla No. XIV-27.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos 3° día.

Metabolito generados utilizando una mezcla de hongos 3° día	
T. Retención	Compuestos
3:01	3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ona
4:42	Acido octanoico
10:36	Undecano
13:22	2,3,4-tricloro anilina
13:44	Acido Fosfórico tributil éster
16:36	Hexatriacontano
18:05	Decano
19:29	Hexatriacontano
19:43	2,6-dimetil-Heptadecano
22:15	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
22:32	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
23:04	bis(2-metilpropil)éster -Ac. 1,2-bencendicarboxilico
24:55	Hexatriacontano
25:28	bis(2-metoxi etil) ester -Ac. 1,2 bencendicarboxilico
27:29	Hexatriacontano
29:16	2-metil-1-hexadecanol
29:59	Hexatriacontano
31:40	2,2',3,4,4',5'-hexa CB
32:37	Hexatriacontano
32:59	2,2',3,4,4',5'-hexa CB
34:56	Hexatriacontano
37:18	bis(2-etilhexil) éster- Ac. hexanodioico,
41:09	bis(2-etil hexil) ester- Ac. 1,2 bencendicarboxilico

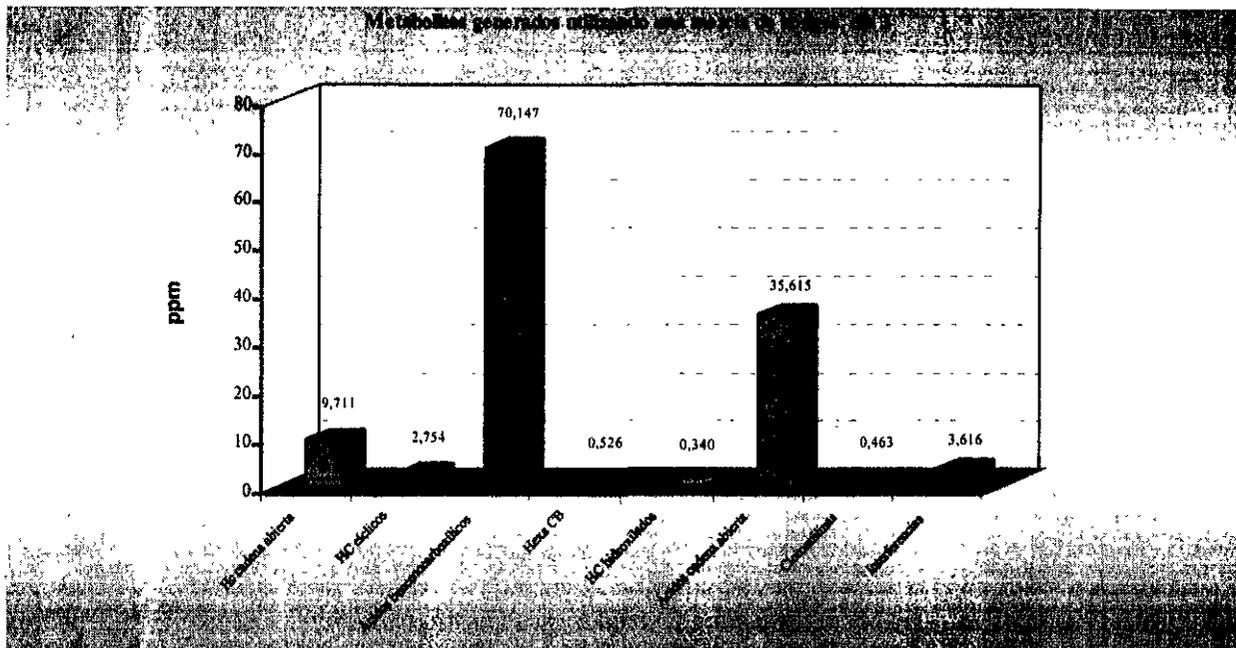


Fig. No.XIV-46.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos 3º día.

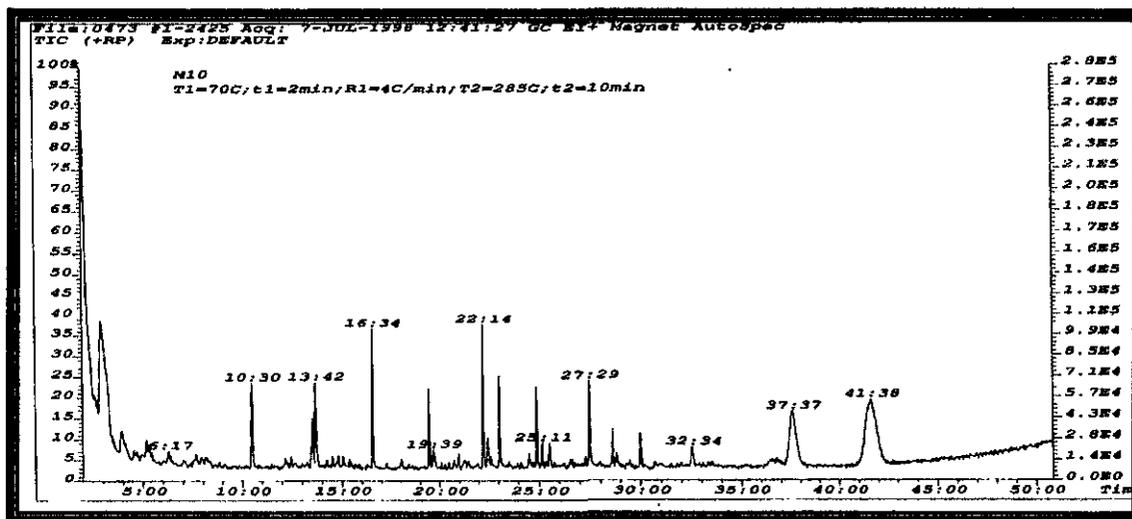


Fig. No.XIV-47.-Cromatograma de los metabolitos generados al 7º día en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos.

Tabla No. XIV-28.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos 7° día.

Metabolito utilizando una mezcla de hongos 7° día	
T. Retención	Compuestos
2:57	3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ona
10:30	Undecano
13:33	3-etil-2-metil-hexano
13:42	Acido Fosfórico, tris(2-etilhexil) éster
14:32	3-etil-2-metil-hexano
14:50	5,6-dimetil-decano
16:34	Hexatriacontano
19:27	Hexatriacontano
19:39	5,6-dimetil-decano
20:59	2,3-dimetil-heptano
22:14	Hexatriacontano
22:28	5,6-dimetil-decano
23:04	bis(2-metilpropil)-Acido 1,2-bencendicarboxílico
24:31	2,4-dimetil-1-heptanol
24:54	4,5-dimetil-nonano
25:11	1,2-dimetil-3-pentil-4-propil-ciclohexano
25:30	Ac. 1,2 bencendicarboxilico dodecil ester
27:29	Hexatriacontano
28:37	2-metil-1-dodecanol
28:49	2-metil-1-dodecanol
30:00	tritetracontano
32:34	4,5-dimetil-nonano
37:37	Acido hexanodioico, dioctil éster
41:38	bis(2-etilhexil) ftalato

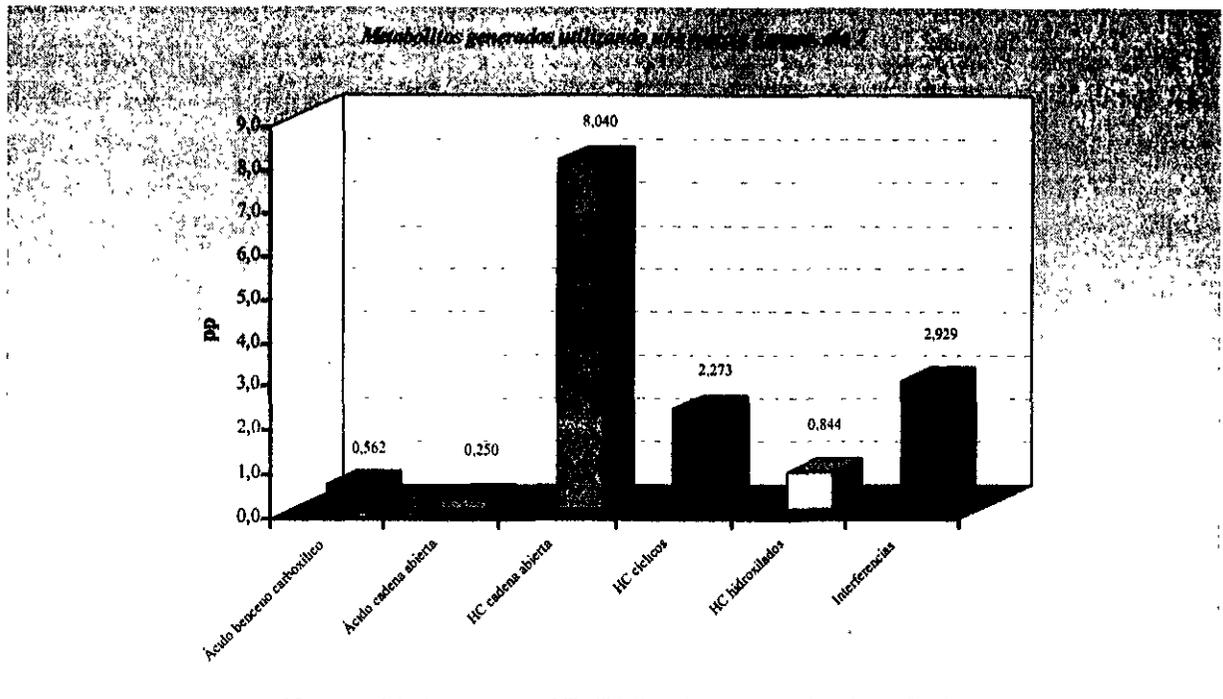


Fig. No.XIV-48.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos 7° día.

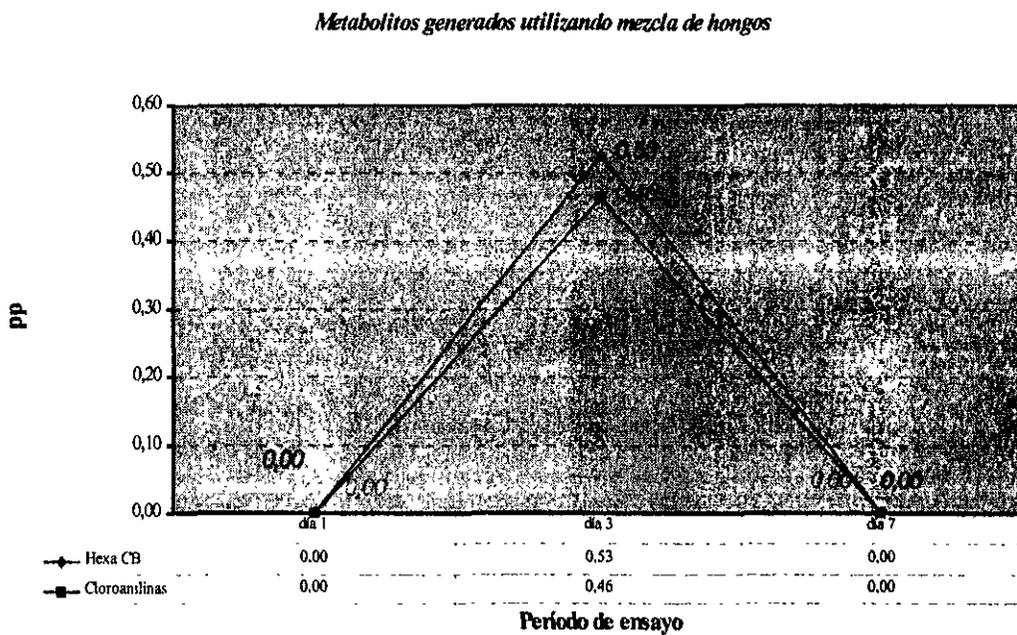


Fig. No. XIV-49.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de hongos 1°, 3° y 7° día.

Como se observa, los congéneres hexaclorobifenilos y cloroanilinas generados en el bioensayo utilizando la mezcla de hongos, son biodegradados completamente al séptimo día de tratamiento.

14.11.4. Bioensayo con mezcla de todos los microorganismos

Las tablas XIV-29 a la XIV-31 presenta los principales compuestos formados de la biodegradación del BPC aminado en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos y sus respectivos tiempos de retención. Las figuras XIV-50 a la XIV-56 presentan los cromatogramas y gráficas correspondientes de los metabolitos generados en el bioensayo.

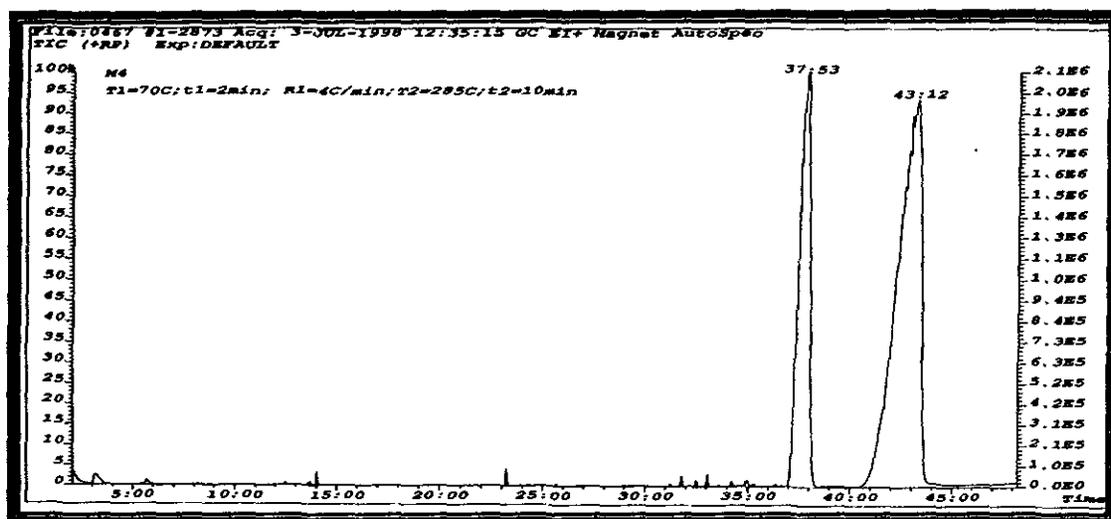


Fig. No. XIV-50.- Cromatograma de los metabolitos generados al 1º día en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos.

Tabla. No. XIV-29.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando la mezcla de todos los microorganismos 1º día.

Metabolitos utilizando una mezcla de todos los microorganismos 1º día	
T. Retención	Compuestos
3:10	2-ciclohexan-1-one- 3,5,5, trimetil (alfa isoforona)
5:42	pentano dodecafluor
12:29	1,2,4 tricloro 5-nitrobenzeno
13:41	1,2,3 tricloro 2-metoxibenzeno
14:01	Ac. Fosfónico tris(2-etil hexil) ester
14:25	2,4,5 tricloroanilina
16:51	2-ciclohexilpiperidina
22:24	4,5-dimetil nonano
23:14	Ac. 1,2,bencendicarboxilico bis(2-metoxi etil) ester
25:04	2-ciclohexil piperidina
27:36	4,5-dimetil nonano

27:41	22', 44', 6 penta CB
28:58	23', 44', 6 penta CB
30:10	Hexacosano
31:15	22', 34', 5'6 hexa CB
31:47	22', 34', 5'6 hexa CB
32:32	Hexatriacontano
33:03	22', 33', 46' hexa CB
33:35	22', 23, 4'5. 6 hepta CB
34:14	22', 34', 5'6 hexa CB
37:53	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
43:12	bis(2-etil hexil) ester -Ac. 1,2,bencdicarboxilico

Fig.No.XIV-51.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos 1° día.

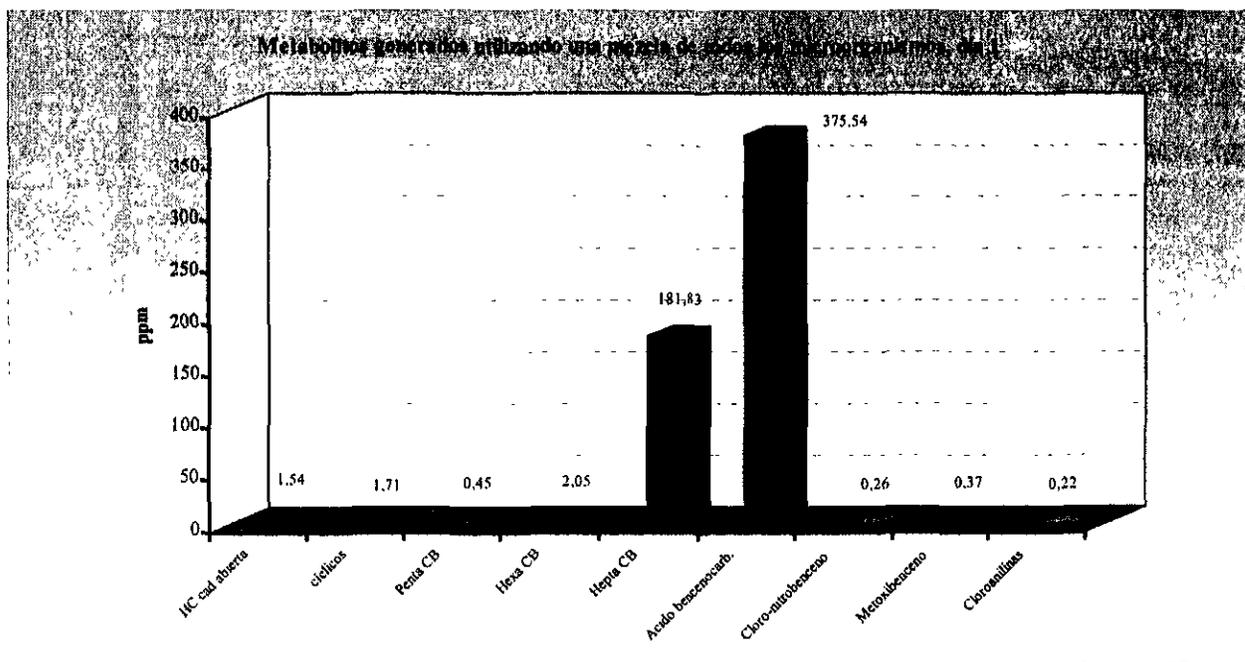


Fig. No. XIV-52.- Cromatograma de los metabolitos generados al 3° día en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos.

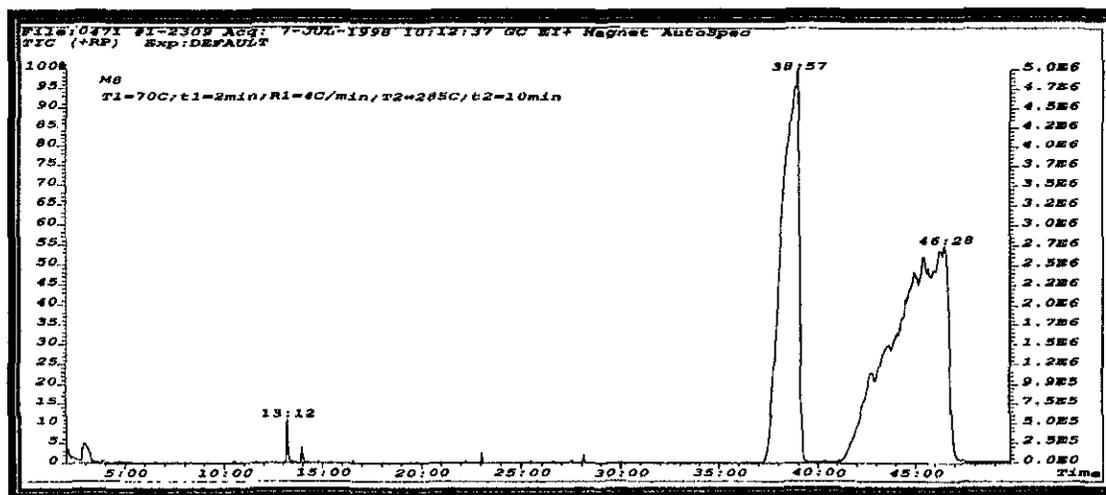
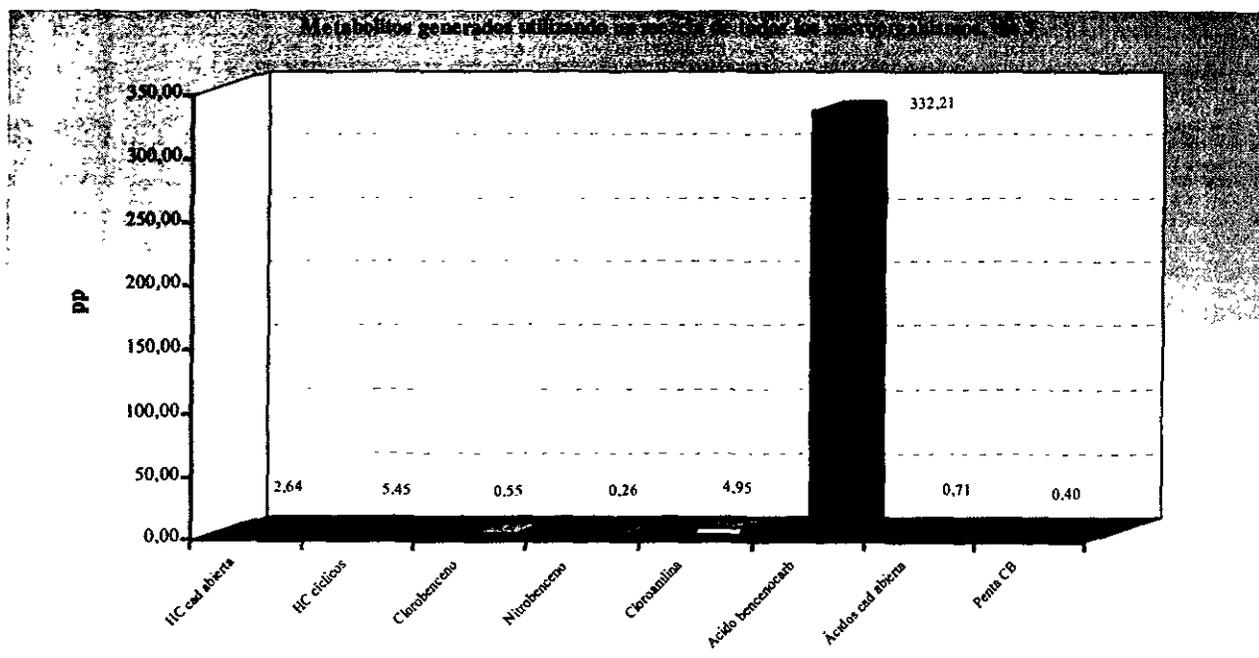


Tabla. No.XIV-30.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando la mezcla de todos los microorganismos 3° día.

Metabolito utilizando una mezcla de todos los microorganismos 3° día	
T. Retención	Compuestos
2:56	2-ciclohexe-1-ona, 3,5,5 trimetil (alfa isoforona)
3:53	1,3,5 triclorobenceno
10:28	Decano
12:06	1,2,3, tricloro-4-nitrobenceno
13:12	2,3,4, tricloroanilina
13:56	2,3,4 tricloroanilina
14:49	4,5-dimetil nonano
15:22	Ac. Bencendicarboxilico di-doctil ester
16:33	2,6- dimetil decano
19:27	3-etil-2metil hexano
19:46	4,5-dimetil nonano
20:59	5,6-dimetil decano
22:15	4,5-dimetil nonano
23:03	bis(2-metoxi etil) ester -Ac. bencendicarboxilico
24:55	decano
25:29	Ac. bencendicarboxilico didoetil ester
26:31	5-etil-1-nonene
26:39	4,5-dimetil nonano
27:30	1-decene e,4-dimetil
28:06	bis(2-etil hexil) ester -Ac. hexadenoico
30:58	decano
36:25	22', 44', 6 penta CB
38:57	Ac. bencendicarboxilico didoetil ester

Fig. No.XIV-53.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos al 3° día.



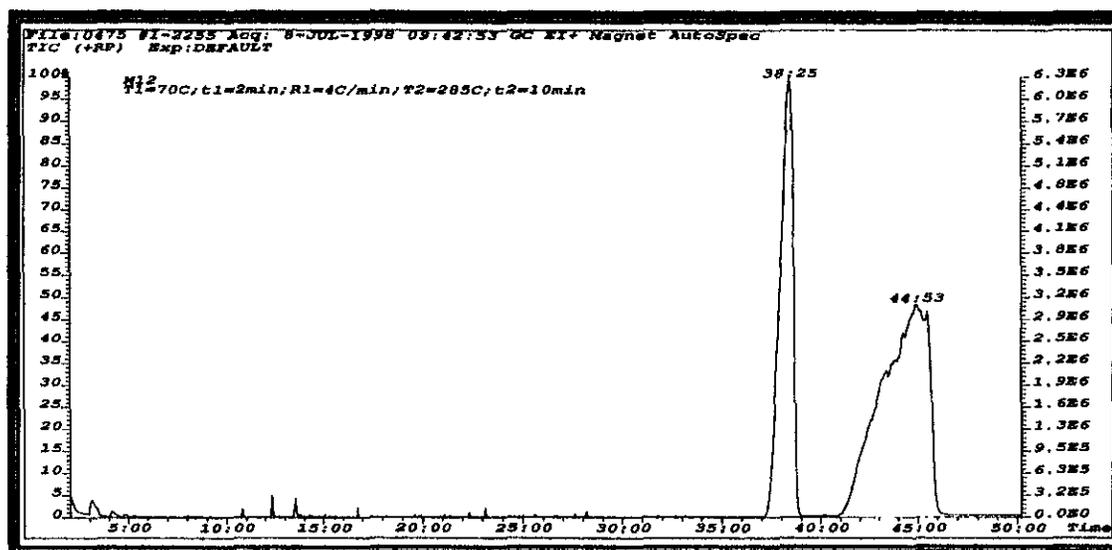


Fig. No. XIV-54.- Cromatograma de los metabolitos generados al 7° día en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos.

Tabla. No. XIV-31.- Tiempos de retención y metabolitos generados en el bioensayo utilizando la mezcla de todos los microorganismos 7° día.

Metabolito utilizando una mezcla de todos los microorganismos 7° día	
T. Retención	Compuestos
3:08	3,5,5, trimetil ciclohexa-2-en 1 (alfa isoforona)
4:10	1,2,4 triclorobenceno
4:49	1,2,4 triclorobenceno
10:47	4,5 dimetil nonano
12:21	1,2,3, tricloro-4-nitrobenceno
13:33	1,3,5 tricloro-metoxibenceno
13:44	tetradecano
14:15	2,4,5, tricloroanilina
14:46	4,5-dimetil nonano
15:04	4,5-dimetil nonano
15:17	4,5-dimetil nonano
15:35	4,5-dimetil nonano
16:45	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
19:36	4,5-dimetil nonano
19:55	2,6 dimetildecano
20:53	6-metil heptanol-1
21:07	4,5-dimetil nonano
21:27	2-butil- octanol-1
22:21	4,5-dimetil nonano
23:09	bis(2-metil propil) ester -Ac. bencendicarboxilico
25:01	4,5-dimetil nonano

25:34	2-metil -heptanol-1
26:35	bis(2-metoxi etil) ester- Ac. bencendicarboxílico
26:43	2,4-dimetil -decene-1
27:34	4,5-dimetil nonano
28:10	Ac. adípico (Ac. hexanodioico dioctil ester)
30:06	3-etil-2-metil hexano
31:01	2-sec-butil ciclopentanona
31:47	22', 34', 5'6 hexa CB
32:04	2-sec-butil ciclopentanona
32:39	4,5-dimetil nonano
33:09	22', 34', 5'6 hexa CB
34:24	22', 34', 5'6 hexa CB
35:23	22', 34', 4'5, 6 hepta CB
36:22	2,4,6,8 tetrametil-1-undecane
38:25	Ac. Adípico dioctil ester (hexanodioico dioctil ester)
44:53	bis(2-etil hexil) ester- Ac. bencendicarboxílico

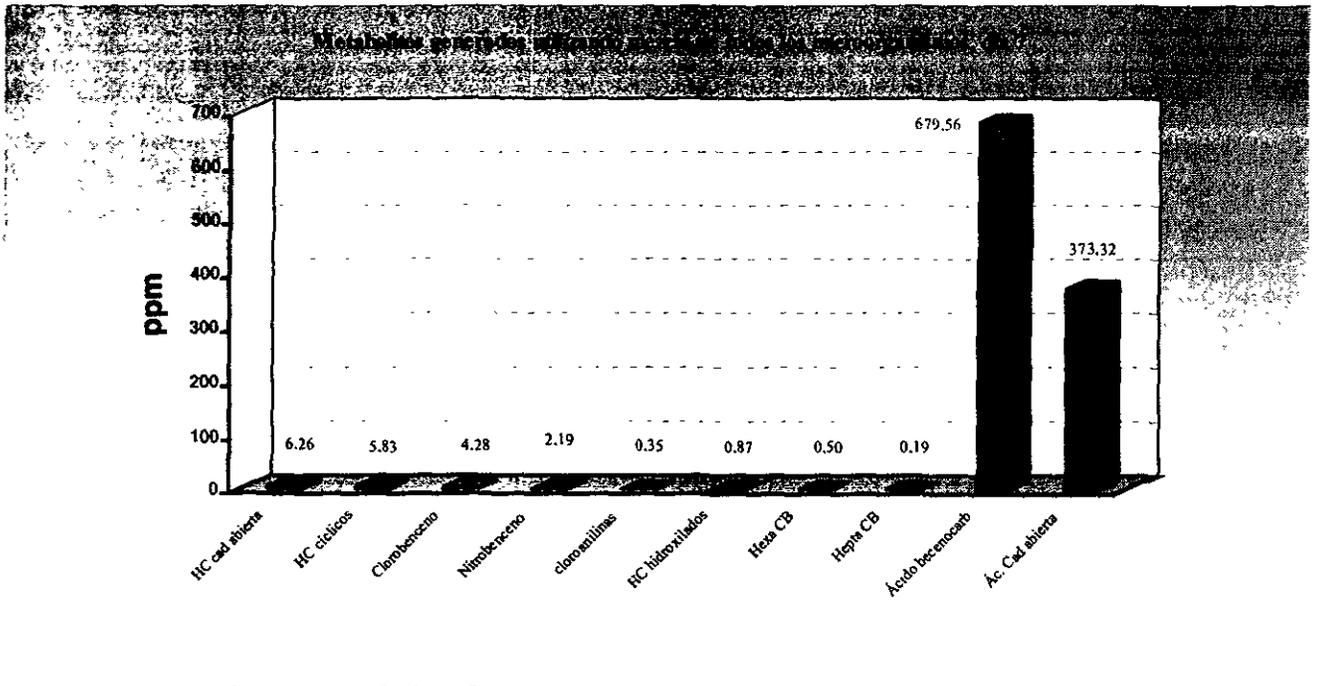


Fig. No. XIV-55.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos al 7º día

Metabolitos generados utilizando una mezcla de todos los microorganismos

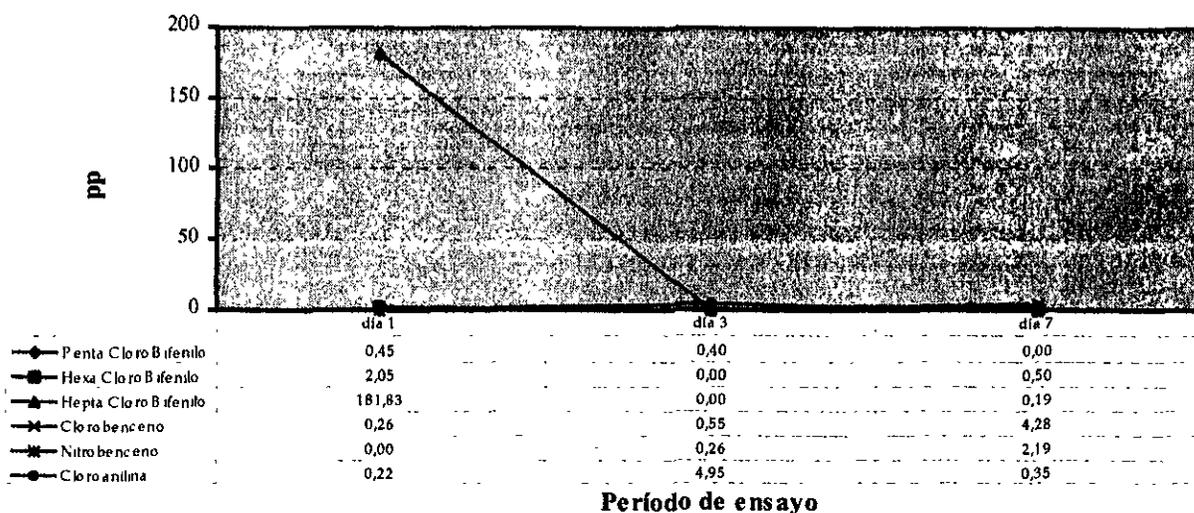


Fig. No. XIV-56.- Metabolitos generados en el bioensayo utilizando una mezcla de todos los microorganismos 1°, 3° y 7° día

Como se observa, los congéneres pentaclorobifenilos son biodegradados completamente en el ensayo utilizando la mezcla de todos los microorganismos; los congéneres hexa y heptaclorobifenilos son biodegradados al tercer día de tratamiento sin embargo, vuelven aparecer al séptimo día aunque en una pequeña concentración.

Los compuestos cloroanilinas tienden a ser biodegradados sin embargo, los compuestos cloro y nitrobenzenos tienden a acumularse en el medio conforme transcurre el período de tratamiento.

Los trabajos de biodegradación de BPCs desarrollados hasta el momento, han sido realizados utilizando cepas puras de microorganismos y con isómeros sencillos. Sin embargo, cuando se trabaja con mezclas de isómeros, el proceso de biodegradación se complica. En el presente estudio se consideró necesario abordar el tema aprovechando toda la información generada por los diferentes autores sobre la selección de diferentes cepas capaces de degradar BPCs y la posibilidad de utilizar reactores de biomembrana como tecnología de punta, complementando el proceso con un pretratamiento de aminación de la molécula.

En la investigación, los procesos químicos y biológicos en conjunto, representan un nuevo interés tecnológico, ya que supone el vencimiento de uno de los mecanismos que limitan la ruptura enzimática de este tipo de compuestos que reducen la eficiencia de los procesos de tratamiento biológicos actuales. Sin embargo, es imprescindible realizar un análisis detallado de todos los mecanismos enzimáticos del proceso para poder trabajar con tecnología de biomembranas para la eliminación de BPC de una manera fiable y eficaz.

14.11.5. Análisis del tratamiento en los bioensayos

Al realizar la comparación de los metabolitos obtenidos en cada uno de los bioensayos, se observa que existe una marcada diferencia en el número de componentes generados al primer, tercer y séptimo día del tratamiento de biodegradación en los cuatro bioensayos.

Si bien, la mayor parte de los tetra, penta y algunos isómeros de hexaclorobifenilos son biodegradados rápidamente según se muestran en la tabla XIV-32. Un pequeño porcentaje de estos compuestos permanece inalterado en concentraciones que varían con el período de tratamiento; algunos isómeros de hexa, hepta y octaclorobifenilos se degradan muy lentamente durante períodos de tiempo superiores a 5 días, pero generalmente permanecen inalterados. Los compuestos clorobenceno y cloronitrobenzenos son biodegradados en diferentes proporciones dependiendo del tipo de microorganismo. Sin embargo, los compuestos cloroanilinas son biodegradados rápidamente en los cuatro bioensayos realizados.

Se ha podido constatar, que parámetros como el pH y la temperatura en los bioensayos afectan considerablemente el proceso de biodegradación. Al inicio del tratamiento aerobio, la degradación es muy lenta en todas las temperaturas ensayadas (24, 26, 28 y 30°C) incrementándose considerablemente a medida que progresa el período de tratamiento, siendo la temperatura óptima 24 °C para el proceso; la velocidad de degradación se incrementó en el bioensayo superándose el 60 % de degradación final de los BPC. La tabla XIV-33 presenta los parámetros determinados en los bioensayos. Aunque la biodegradación de los BPC aminados fue igualmente efectiva en las condiciones ensayadas, resultó más lenta que la correspondiente a la del reactor aerobio.

Tabla No.XIV-32.- Metabolitos organoclorados detectados en los bioensayos.

Mezcla de bacterias		
1° día	3° día	7° día
	1,2,3-tricloro-4-nitrobenzeno	1,2,4-triclorobenceno
	2,3,4-tricloroanilina	1,2,3-tricloro-4-nitrobenzeno
	22', 34, 4'5-hexaclorobifenilo	22', 34, 4'5-hexaclorobifenilo
Phanerochaete chrysosporium		
1° día	3° día	7° día
1,3,5-triclorobenceno	1,2,4-tricloro-5-nitrobenzeno	33', 44', 55-hexaclorobifenilo
1,2,3-tricloro-4-nitrobenzeno	33', 44', 55'-hexaclorobifenilo	
2,3,4-tricloroanilina		
22', 34,4'5-hexaclorobifenilo		
22', 34, 56, 6'-hexaclorobifenilo		
22', 34, 4'5, 6-heptaclorobifenilo		
Mezcla de hongos		
1° día	3° día	7° día
	2,3,4-tricloroanilina	
	22', 34, 4'5'-hexaclorobifenilo	
Mezcla de todos los microorganismos		
1° día	3° día	7° día
1,2,4-tricloro-5-nitrobenzeno	1,3,5-triclorobenceno	1,2,4-triclorobenceno
2,4,5-tricloroanilina	1,2,3-tricloro-4-nitrobenzeno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenzeno
22', 44', 6-pentaclorobifenilo	2,3,4-tricloroanilina	2,4,5-tricloroanilina
22', 34', 5'6-hexaclorobifenilo	22', 44', 6-pentaclorobifenilo	22', 34', 5'6-hexaclorobifenilo
22', 33', 46'-hexaclorobifenilo		22', 34, 4'5,6-heptaclorobifenilo
22', 34,4'5,6-heptaclorobifenilo		

Tabla No. XIV-33.- Parámetros determinados en los bioensayos con extracción de metabolitos.

Microorganismo	Fecha	pH	O ₂ mg/l	Cloruros (mg/l)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17 Junio	6.3	7.9	--
Mezcla de hongos	17 Junio	6.3	7.9	836
Mezcla de bacterias	17 Junio	7.0	7.9	--
Mezcla de todos los microorganismos	17 Junio	7.2	7.9	184.3
			7.9	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	19 Junio	6.3	7.9	694.8
Mezcla de hongos	19 Junio	6.3	7.9	439.5
Mezcla de bacterias	19 Junio	7.1	7.9	354.5
Mezcla de todos los microorganismos	19 Junio	7.1	7.9	340.3
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	22 Junio	6.4	7.9	397.0
Mezcla de Hongos	22 Junio	6.2	7.9	482.1
Mezcla de bacterias	22 Junio	7	7.9	354.5
Mezcla de todos los microorganismos	22 Junio	7	7.9	387.8

14.12. DESCRIPCIÓN DE LOS REACTORES

En los estudios de biodegradación, se emplearon reactores de biomembrana para el soporte de la biomasa construidos con fibras tubulares de silicona en el reactor aerobio y de polipropileno en el reactor anaerobio. Ambos reactores operan en flujo discontinuo durante el proceso de biodegradación, utilizando BPC aminado como única fuente de carbono y nitrógeno. Al reactor aerobio (expresamente contruido para este fin), se le conectaron además, equipos para medir pH, temperatura, oxígeno disuelto y dióxido de carbono en continuo (figuras XIV-57 y XIV-58).

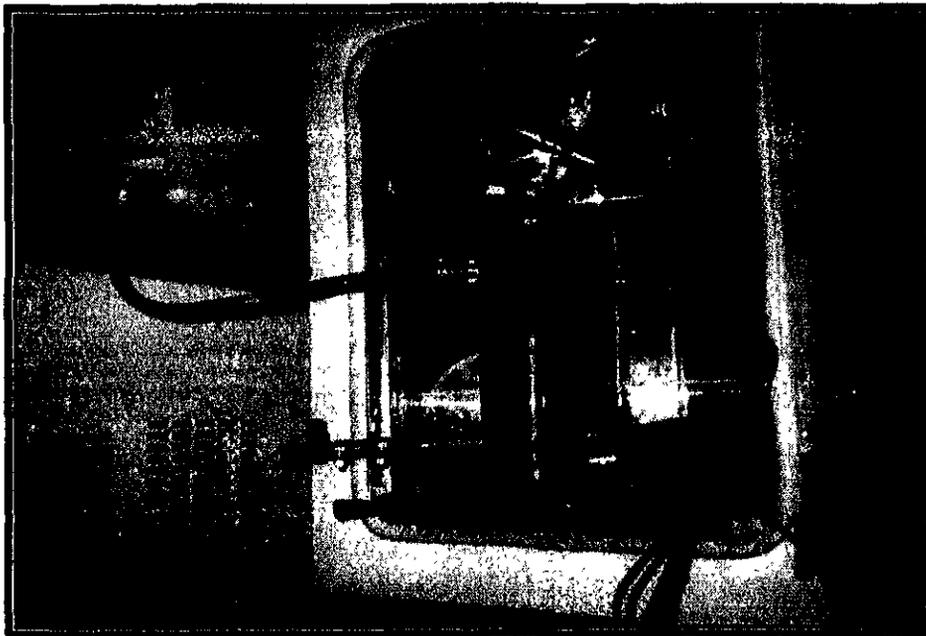


Fig. No. XIV-57.- Detalles del reactor aerobio

En el reactor anaerobio, se aprovecharon la estructura y biopelícula anaerobia desarrollada sobre las membranas del reactor previamente contruido por Cáceres (1996) y utilizado por Castillo (1998) para la eliminación biológica de fósforo en agua residual urbana.

La principal característica de este reactor, es que permite extraer el soporte de las membranas en conjunto para realizar determinaciones y lavado de la biopelícula. Las figuras XIV-59 a la XIV-60 muestran los detalles del reactor anaerobio.



Fig. No. XIV-58.- Equipos de monitoreo de pH, temperatura y O_2 disuelto del reactor aerobio

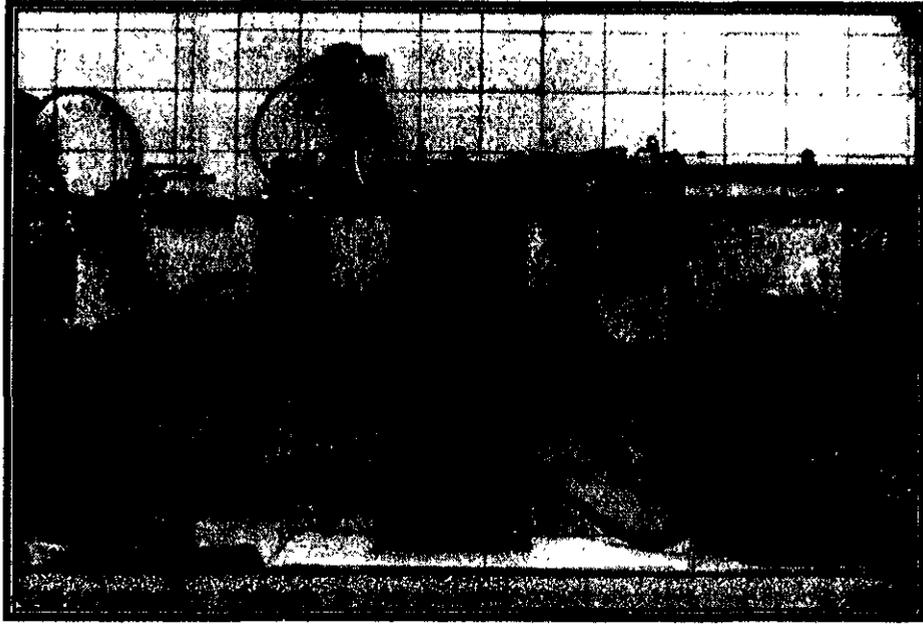


Fig. No. XIV-59.- Detalles del reactor anaerobio

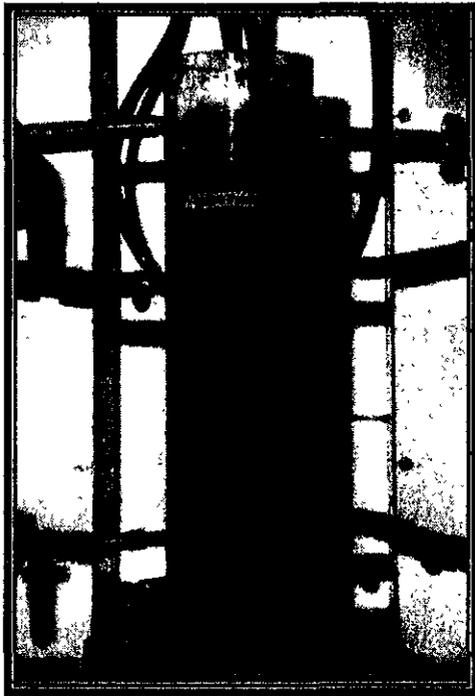


Fig. No. XIV-60.- Detalles del Reactor anaerobio con soporte extraíble

14.13. DESCRIPCIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS DESARROLLADAS EN LOS REACTORES

El desarrollo de la biopelícula en el reactor aerobio, se realiza aproximadamente en 12 días, pero se decidió mantener el crecimiento por 5 días más para asegurar la colonización completa de la membrana.

Durante la determinación del espesor de la biopelícula aerobia en el transcurso de la experimentación, se observa un incremento proporcional con la edad de la biopelícula con rangos desde una capa muy ligera de 0.5 mm al inicio hasta 2.7 mm aproximadamente, de coloración marrón claro a los 17 días.

La biopelícula, es sumamente sensible a la turbulencia producida por incrementos en los sistemas de mezcla y oxigenación del reactor, lo que provocó el desprendimiento masivo de las membranas de silicona una semana después de estar operando. Sin embargo, la población de microorganismos recuperan su actividad de crecimiento con relativa rapidez en un período de 3 a 5 días. Es importante hacer notar, que existe también biomasa en suspensión en el licor de mezcla del reactor que interviene activamente en el proceso de biodegradación.

No ha sido posible determinar características como la densidad, concentración de sólidos, volumen y peso de la biopelícula debido a que para su determinación, el diseño del reactor aerobio no permite la extracción de muestras de biopelícula.

El período de desarrollo de la biopelícula del reactor anaerobio, ha sido de 9 días hasta que las membranas se encontraban completamente pobladas con un espesor promedio que oscila entre 3.5 a 4 mm de coloración pardo intenso (figura XIV-61).

Fig. No. XIV-61.- Detalles de la biopelícula en el reactor anaerobio



La biopelícula anaerobia, se encuentra fuertemente adherida a las membranas de polipropileno, en comparación a la biopelícula del reactor aerobio; aunque pueden existir desprendimientos esporádicos durante la fase de lavado.

14.14. ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO EN EL REACTOR AEROBIO

La tabla XIV-34 presenta los congéneres y concentración a la cual fueron introducidos al reactor para su biodegradación.

Isómero	No. IUPAC	Congénere	Concentración (ppm)
2,2',4,4',6	100	Pentacloro bifenilo	13011,92
22',33',66'	136	Hexaclorobifenilo	38483,29
2,2',3,3',4,4'	129	Hexacloro bifenilo	37702,15
2,2',4,4',6,6'	155	Hexacloro bifenilo	2567,00
2,2',4,4',5,5'	153	Hexacloro bifenilo	2567,00
2,2',3,4,4',5	137	Hexacloro bifenilo	6640,45
2,2',3,4',5',6	149	Hexacloro bifenilo	38888,27
2,2',3,3',5,6'	135	Hexacloro bifenilo	10957,55
2,2',3,4,4',5,6	181	Heptacloro bifenilo	321331,30
2,2',3,4,5,5',6	185	Heptacloro bifenilo	8163,61
2,2',3,3',4,4',55'	194	Octacloro bifenilo	Sin cuantificar
2,2',3,3',4,4',6,6'	197	Octacloro bifenilo	Sin cuantificar
2,2',3,3',4,4',5,6	195	Octacloro bifenilo	Sin cuantificar

Tabla No. XIV-34.- Congéneres de clorobifenilos (que no han sido aminados) introducidos a los reactores junto con los congéneres aminados para su biodegradación.

Los resultados generales de los análisis de biodegradación en el reactor aerobio, permiten observar que los BPCs aminados se degradan a mayor velocidad que los BPCs puros. Un pequeño porcentaje es oxidado a compuestos de tipo clorobencenos, cloronitrobenceno y cloroanilinas que se degradan posteriormente en el mismo reactor.

La evaluación del efecto de la aplicación del surfactante sobre el comportamiento de biodegradación de los BPC aminados en el reactor aerobio, se realizó mediante la determinación de la DQO en un período de una semana notándose un gran incremento en los valores, de lo cual se infiere que los surfactantes son utilizados como fuente de carbono por microorganismos.

14.15. CARGA ORGÁNICA APLICADA EN LOS REACTORES

El reactor de biomembrana aerobio, operó en flujo batch con una aplicación de 20 ml de BPC aminado (26 g) a una concentración de 333 g/L de los isómeros de BPCs que no fue posible que se aminasen. El resultado de la biodegradación ha sido de 12 ml (15.6 g) en un período de 45 días. Teniendo en cuenta un área específica de las membranas (42 cm²), la carga orgánica aplicada es de 137.56 g/m².d y la carga eliminada es de 85 g/m².d. Por lo tanto, el rendimiento del proceso es del 62%.

El reactor biomembrana anaerobio operó en las mismas condiciones que el aerobio. El resultado de la biodegradación ha sido de 10 ml (13 g) en un período de 34 días. Teniendo en

cuenta un área específica de las membranas (0.094 m^2), la carga orgánica aplicada es de $81.35 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$ y la carga eliminada es de $40.6 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$. Por lo tanto, el rendimiento del proceso es del 50%.

14.16. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS GENERADOS

El estudio de los resultados de los metabolitos generados es bastante complejo, debido a la existencia de gran número de compuestos y la bajas concentraciones en que se encuentran algunos de ellos en el medio mineral. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros de masas de los metabolitos detectados con los existentes en la librería interna de la computadora de la "National Boureau of Standars Library". Para su cuantificación, las muestras han requerido de un procedimiento de preconcentración en rotavapor y purificación en columna de florisil

Dado que los reactivos utilizados en el proceso de extracción de los metabolitos comprenden diversos grupos de compuestos, cabe suponer que las interferencias observadas en el comportamiento de los metabolitos identificados se deben a algún tipo de interacción específica entre ellos, lo que influye de forma notable en el comportamiento cromatográfico de los subproductos generados en el estudio de bidegradación.

14.17. METABOLITOS GENERADOS EN EL REACTOR AEROBIO

Las tablas XIV-35 a la XIV-46 presenta los principales compuestos formados de la biodegradación del BPC aminado en el reactor aerobio y sus respectivos tiempos de retención. Las figuras XIV-62 a la XIV-87 presentan los cromatogramas y gráficas correspondientes de los metabolitos generados en el reactor.

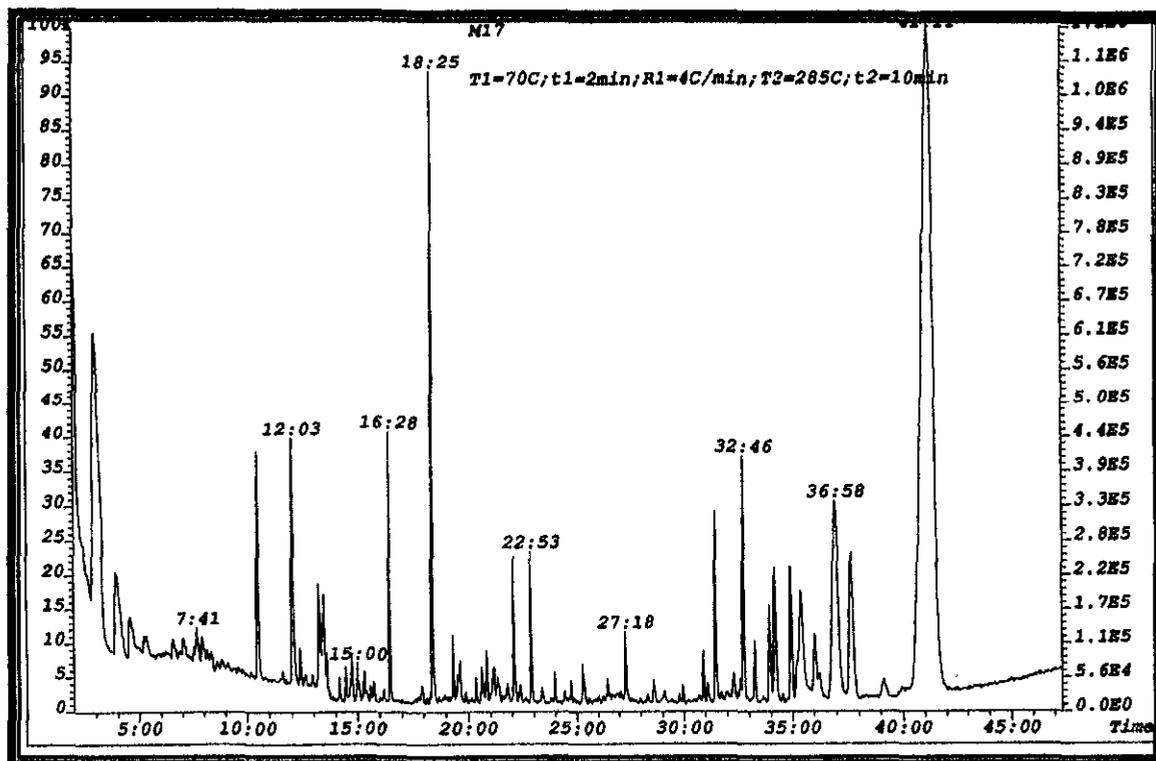


Fig. No. XIV-62.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 1° día.

Tabla No.XIV-35.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 1 día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 1° día	
T. Retención	Compuestos:
3:56	1,2,4 triclorobenceno
10:30	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
12:03	1,2,3 tricloro-4-nitrobenceno
13:16	1,2,3, tricloro-4 nitrobenceno
13:31	Hexatriacontano
14:28	2-butil octanol-1
14:46	4,6,8 trimetil nonene-1
15:00	2-butil octanol-1
15:19	Tetracontano
15:36	Hexacosano
15:45	eter decil vinil (decane 1-eteniloxi)
16:28	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
18:25	bis(1-metil propil) ester -Ac. hexanodioico
19:20	Hexatriacontano
19:38	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
20:37	Hexatriacontano
20:51	2-butil octanol-1
22:06	Hexatriacontano
22:53	bis(2-metil propil) ester -Ac. bencendicarboxilico
23:59	(2,4-dicloro fenoxi)-Ac. Acético

24:44	2,6,10 trimetil dodecano
25:17	Ac. bencendicarboxílico didodecil ester
26:27	Tetradecano
27:18	23, 3'4',6 penta CB
28:36	2,3, 3'4', 6 penta CB
29:58	22', 34, 4'5'hexa CB
30:55	22',33',44'hexa CB
31:28	22', 34, 4'5'hexa CB
32:18	Hexatriacontano
32:46	33', 44', 55'hexa CB
33:17	23,3'4',55',6 hepta CB
33:57	22', 34, 4'5'hexa CB
34:12	Ac. Bendendicarboxílico butil fenil metil ester
34:56	22',33', 55',6 hepta CB
35:25	22', 34,4'5', 6 hepta CB
36:02	23, 3'4, 4'5', 5'hepta CB
36:58	bis(2-etilhexil) ester -Ac. Hexanodioico
37:42	2,3, 3'4', 55', 6 hepta CB
39:08	23, 3'4', 55', 6 hepta CB
41:11	bis(2-etil hexil) ester -Ac. bencendicarboxílico

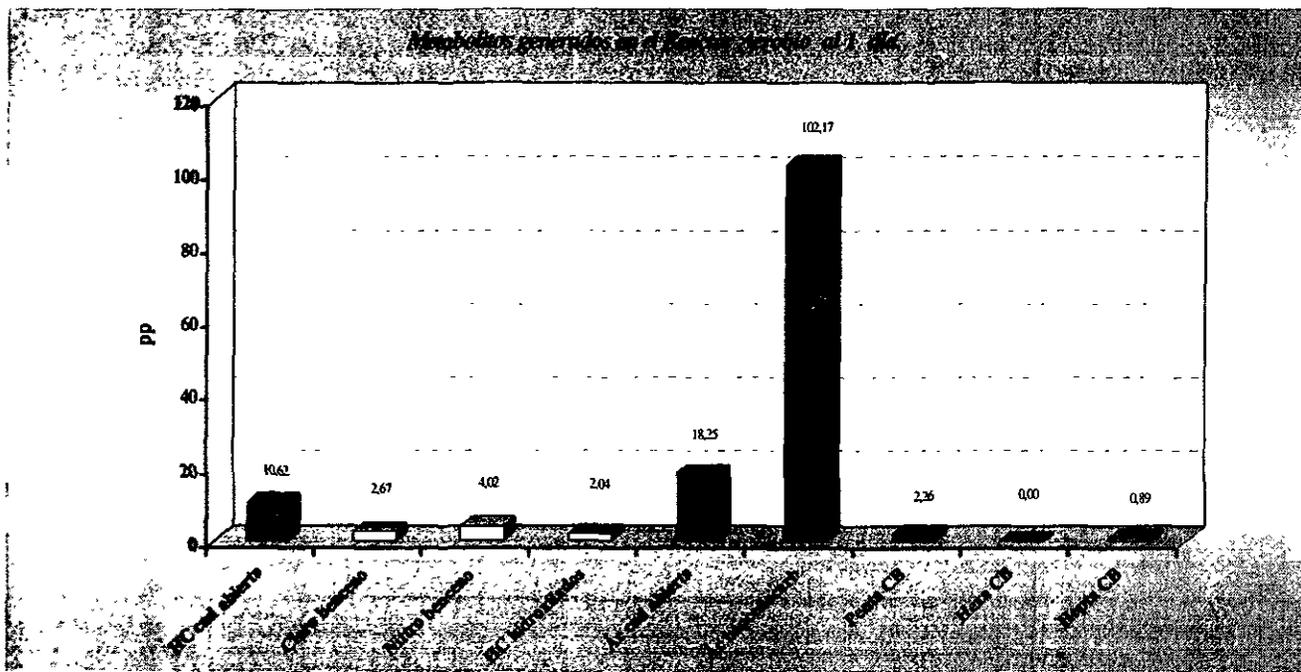


Fig. No.XIV-63-.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 1° día.

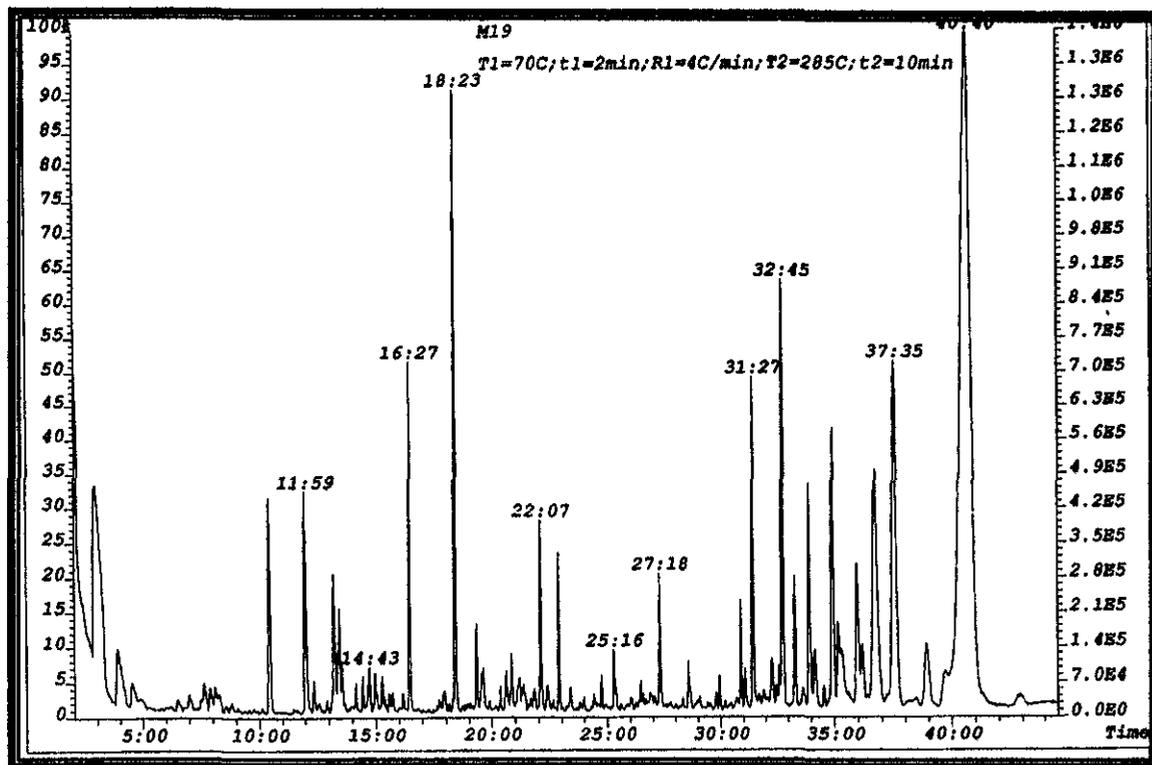


Fig. No. XIV-64.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 2º día.

Tabla No. XIV-35.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 2 día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 2º día	
T. Retención	Compuestos:
3:54	1,2,4 triclorobenceno
10:27	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
11:59	1,2,3 tricloro-4-nitrobenceno
12:22	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
13:13	1,3,5 tricloro-2-nitrobenceno
13:28	2-metil hexadecano
14:09	2-hexil, 1-decanol
14:27	2-butil 1-octanol
14:43	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
14:59	Tetracontano
15:17	Hexatriacontano
15:35	Tridecano
15:44	2 metil 1-dodecil
16:09	2-butil 1-octanol
16:27	Hexatriacontano
17:56	Hexatriacontano
18:23	bis(2-metil propil) ester -Ac. hexadenoico
19:21	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
19:34	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
20:38	Tetracontano

20:51	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
22:07	Hexatriacontano
22:53	bis (2-metil propil) ester -Ac. 1,2 bencendicarboxilico
24:45	Hexadecano
25:16	Ac. 1,2 bencendicarboxilico butil octil ester
27:18	22', 44', 6 penta CB
28:35	22', 44'5 penta CB
29:57	22', 33', 44'hexa CB
30:54	22', 33', 44'hexa CB
31:05	22', 34, 4'5'hexa CB
31:27	22', 33', 44', hexa CB
32:47	Hexatriacontano
32:45	33', 44', 55'hexa CB
33:19	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
33:56	22', 34, 4'5'hexa CB
34:10	bencil butil phatalato
34:57	22', 33', 55', 6 hepta CB
35:10	23, 3'4', 55'6 hepta CB
35:58	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:12	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:45	bis(2-metil hexil) ester -Ac. hexadenoico
37:35	22', 33', 55', 6 hepta CB
38:56	22', 33', 55', 6 hepta CB
39:43	22', 33', 45', 66'Octa CB
40:40	bis(2-metil hexil) ester -Ac. bencendicarboxilico

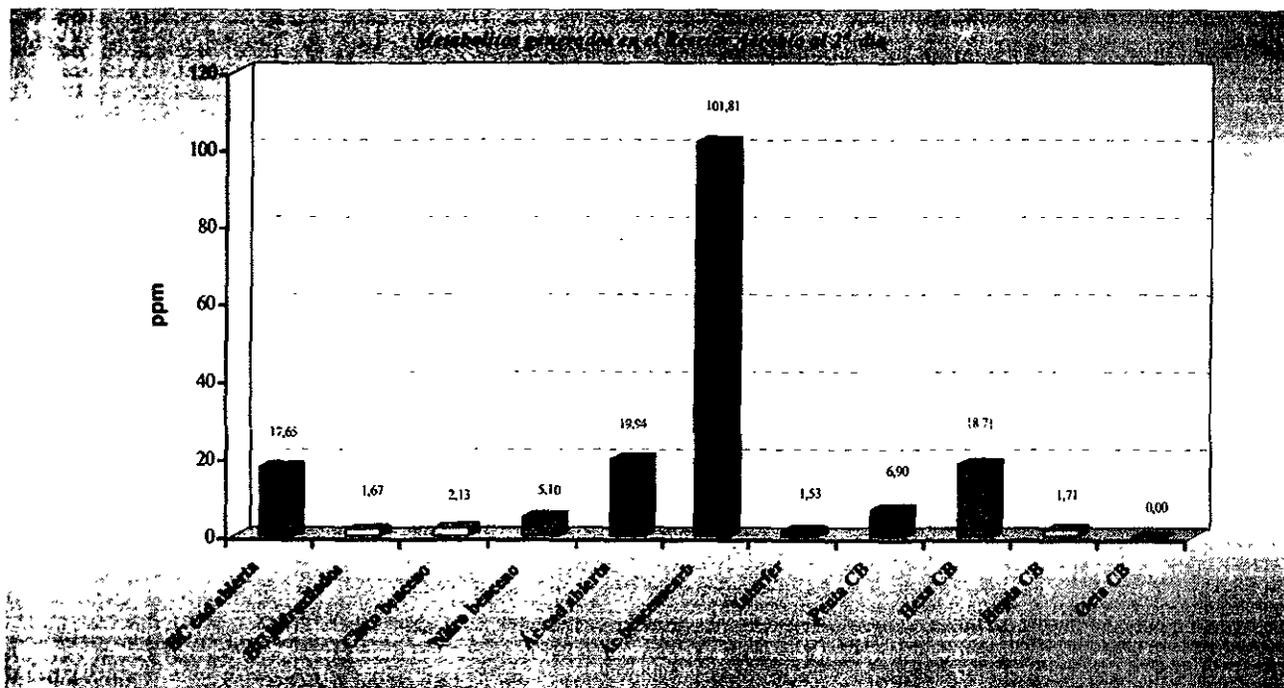


Fig. No. XIV-65.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 2° día.

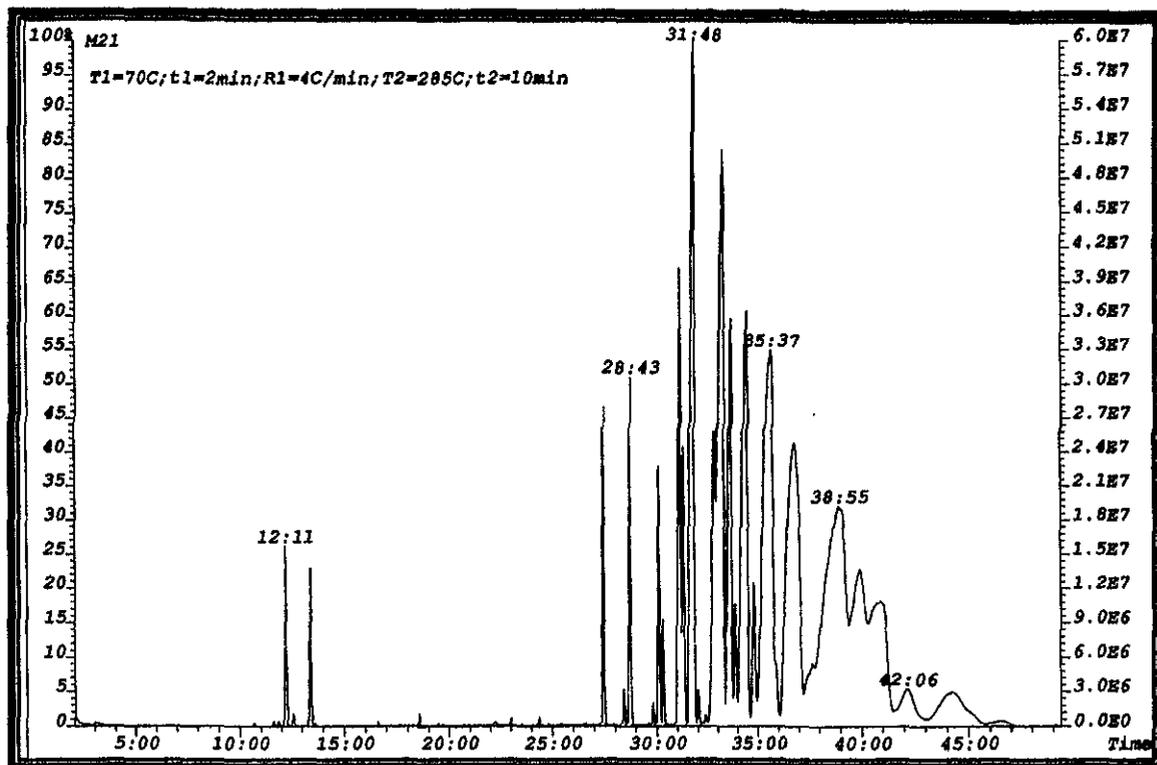


Fig. No. XIV-66.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 3° día.
 Tabla No. XIV-36.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 3 día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 3° día	
T. Retención	Compuestos:
4:06	1,2,4 triclorobenceno
10:39	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
11:37	1,2,3 tricloro- 4-nitrobenceno
12:11	1,2,4 tricloro- 5-nitrobenceno
12:31	1,2,4 tricloro- 5-nitrobenceno
13:24	1,2,3 tricloro- 4-nitrobenceno
16:36	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
18:31	bis(2-metil propil) ester -Ac. hexanodioico
19:27	hexadecano
20:57	tetracontano
22:11	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
22:59	Ac. 1,2.-bencendicarboxilico butil 2-metil propil ester
24:21	22', 5 6 tetra CB
24:51	Hexatriacontano
25:27	Ac. 1,2.-bencendicarboxilico butil 2-metil propil ester
26:33	Tetracontano
27:26	22', 44', 6 penta CB
28:23	22', 44', 6 penta CB
28:43	23', 44', 5 penta CB

29:48	22', 44', 6 penta CB
30:06	33', 44', 55' hexa CB
30:16	22', 44', 5 penta CB
31:06	22', 34, 55' hexa CB
31:15	22', 34, 55' hexa CB
31:48	22', 34, 4'5' hexa CB
32:50	22', 34, 55' hexa CB
33:16	22', 44', 66' hexa CB
33:40	22', 34, 56,6' hepta CB
33:53	22', 34, 56, 6' hepta CB
34:26	22', 44', 66' hexa CB
34:50	22', 34, 56, 6' hepta CB
35:37	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
36:48	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
38:55	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
39:55	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
40:54	22', 33', 44', 55' octa CB
42:06	22', 33', 44', 56' octa CB
44:13	22', 33', 44', 55' octa CB

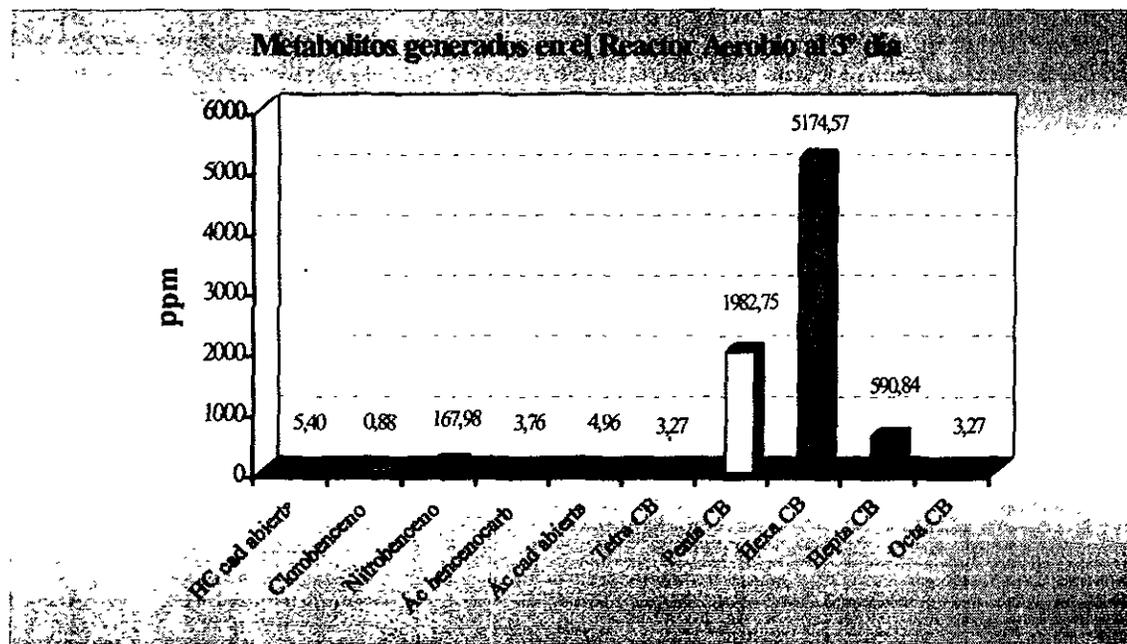


Fig. No.XIV-67.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 3° día.

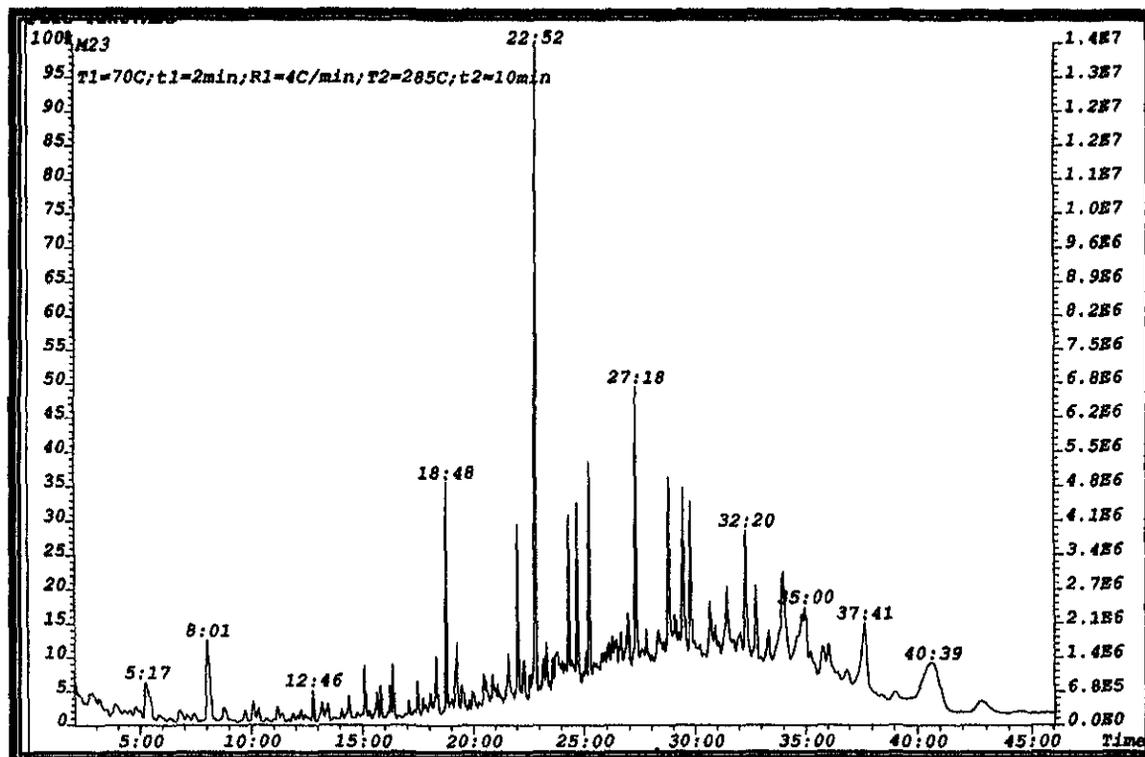


Fig. No. XIV-68.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 4º día.

Tabla No. XIV-37.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio 4 día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 4º día	
T. Retención	Compuestos:
5:17	5 butil dihidro 2(3H)-furanona.
8:01	dihidro 5 pentil 2(3H)-furanona
12:46	2-tridecanona
15:46	Ac. 1,2 bencendicarboxilico dodecil ester
15:50	2-tridecanona
16:14	-(etiloxi)hexadecano
16:21	2-butil 1-octanol
17:29	5 butil dihidro 5 butil dihidro 2(3H)-furanona.
18:19	bis(2-metil propil)ester -Ac. hexadecanoico
18:48	2- pentadecanona
19:16	2,5,24 trimetil tetracontano
22:04	Tetracontano
22:52	bis(2metil propil) ester -Ac 1,2 bencendicarboxilico
24:22	2-nonadecanona (metil heptadecil ketona)
24:43	Pentatriacontano
25:15	bis(2metil propil) ester -Ac 1,2 bencendicarboxilico
27:18	Tritetracontano
28:47	3-metil, 2,6-dioxo Ac. 4-hexanoico,
29:28	5-hidroxi delta lactona -Ac. Octadecanoico
29:49	Pentatriacontano

31:29	22', 34, 55' hexa CB
32:20	Tritetracontano
32:47	22', 44', 66' hexa CB
33:59	22', 44', 66' hexa CB
34:52	Octadecano
35:00	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
35:45	Ac. Octadecanoico butil ester
36:03	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
37:41	22', 34, 56', 6 hepta CB
40:40	di- N- octyl phtalato.

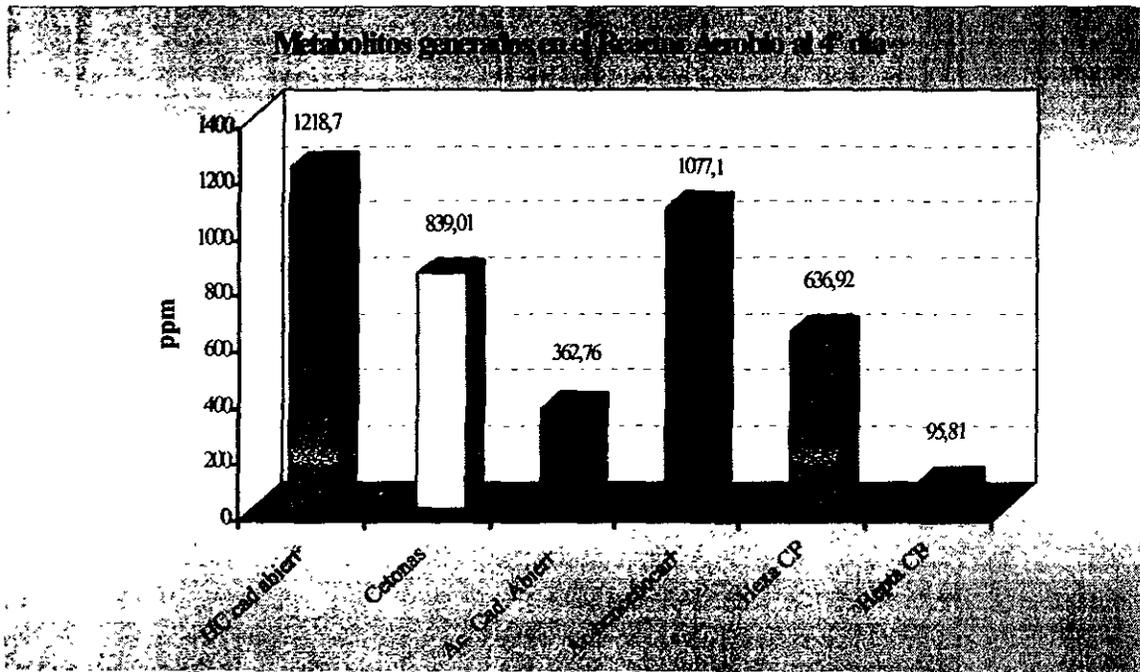


Fig. No.XIV-69.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 4° día.

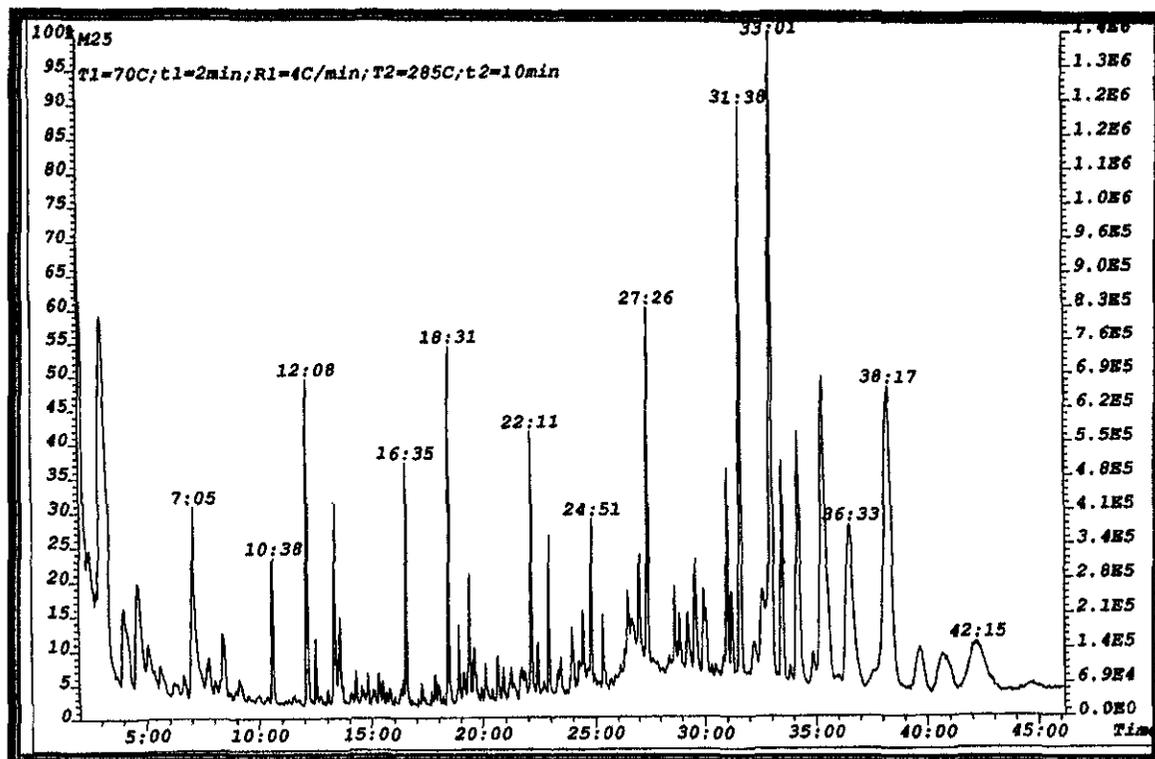


Fig. No. XIV-70.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 5° día.

Tabla No. XIV-38.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 5 día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 5° día	
T.Retención	Compuestos generados
4:08	1,2,4 triclorobenceno
10:38	Heptadecano
12:08	1,2,3 tricloro-4-nitrobenceno
12:32	1-hexadecanol 2-metil
13:22	1,3,5 tricloro 2-nitrobenceno
13:37	Hexadecano
14:19	Tridecanol
14:53	6-etil, 2-,etil octano
15:21	Ac. 1,2 bencendicarboxilico dietil ester
16:35	Hexatriacontano
18:31	bis(2-metil propil) ester-Ac. Hexanodioico (acido adipico)
18:58	Oxireno (cetoxometil)
19:27	Hexatriacontano
22:11	Hexatriacontano
22:58	bis(2-metil propil) ester -Ac. 1,2 bencendicarboxilico
24:00	1,12- dihidro oxi-octadecano
24:51	Hexatriacontano
27:26	22', 45, 6'penta CB
28:41	23, 3'4,6 penta CB
29:37	Undecanol

31:03	22', 33', 44' hexa CB
31:38	22', 33', 44', hexa CB
32:36	33', 44', 55' hexa CB
33:01	22', 44', 66' hexa CB
33:31	22', 34, 4'5, 6 hepta CB
34:14	33', 44', 55' hexa CB
35:19	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:33	22', 33', 55', 6 hepta CB
38:17	23, 3'4', 55, 6 hepta CB
39:44	22', 33', 55', 6 hepta CB
40:45	22', 33', 44', 55' octa CB
42:15	bis(2-metil propil) ester- Ac. 1,2 bencendicarboxílico

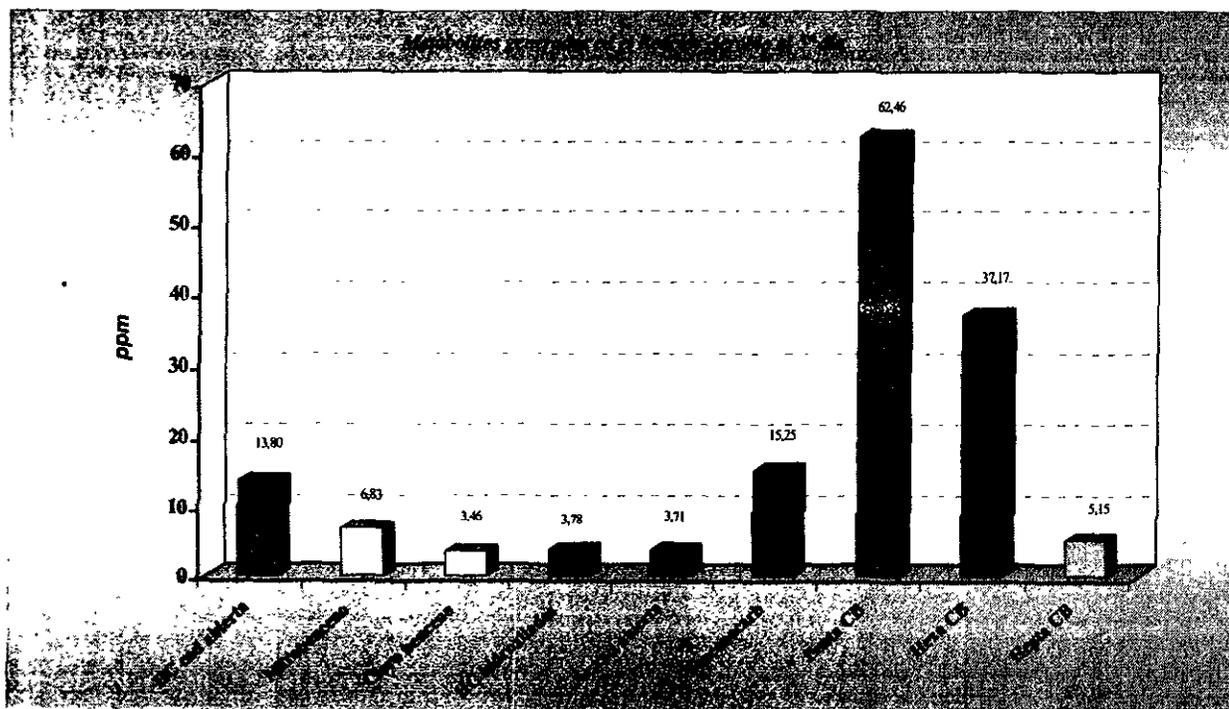


Fig. No.XIV-71.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 5° día

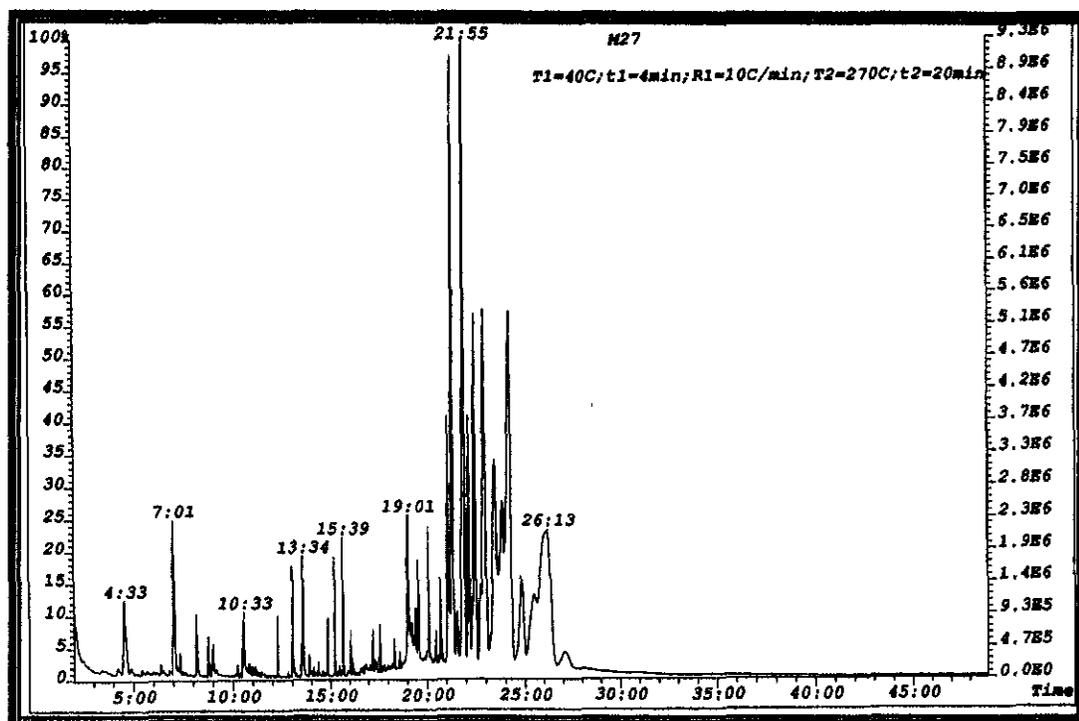


Fig. No. XIV-72.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 7° día
 Tabla No. XIV-39.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 7° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio 7° día	
T. Retención	Compuesto
4:33	2,2,4,6,6-pentametil heptano
7:01	3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-ona
7:21	1,1,-dietoxi-2metil propano
8:09	1,2,3-triclorobenceno
8:45	1,2,3-triclorobenceno
9:00	acido octanoico
10:33	acido nonanoico
10:47	Tetradecano
10:52	1-eteniloxi-decano
10:59	3,7,11-trimetil-1-dodecanol
11:07	2-butil-1-octanol
11:11	Tetradecano
12:14	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
13:01	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:34	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno
13:54	2,3,4-tricloroanilina
14:51	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
15:14	4-fluoro-3-hidroxi-acido benzoico
15:39	bis,(2-metilpropil)ester acido hexanedioico
16:04	3-metil-5-propil-nonano
17:13	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano

17:34	1,2-acido bencendicarboxílico
18:19	Tetratetracontano
18:34	didodecil ftalato
19:01	acido hexadecanoico
19:33	2,2',4,4',,6-penta(CB)
20:05	2,3,4,4,5-penta(CB)
20:41	2,2',3,3',4,6',hexa(CB)
21:05	2,2',3,4',5,6-hexa(CB)
21:20	2,2',3,4',5',6-hexa(CB)
21:55	2,2',3,4',5',6-hexa(CB)
22:10	2,2',3,3',5,5',6-hepta(CB)
22:28	2,2',3,4',5',6-hexa(CB)
22:55	2,2',3,4,4',5,6-hepta(CB)
23:27	2,2',3,4,4',5,6-hepta(CB)
23:51	acido hexanodioico
24:13	2,2',3,4,4',5,6-hepta(CB)
24:50	2,2',3,4,4',5,6-hepta(CB)
25:30	2,2',3,3',4,4',5,5'-octa(CB)
26:13	acido 1,2-bencendicarboxílico
27:02	2,2',3,3',4,4',5,6',-octa(CB)

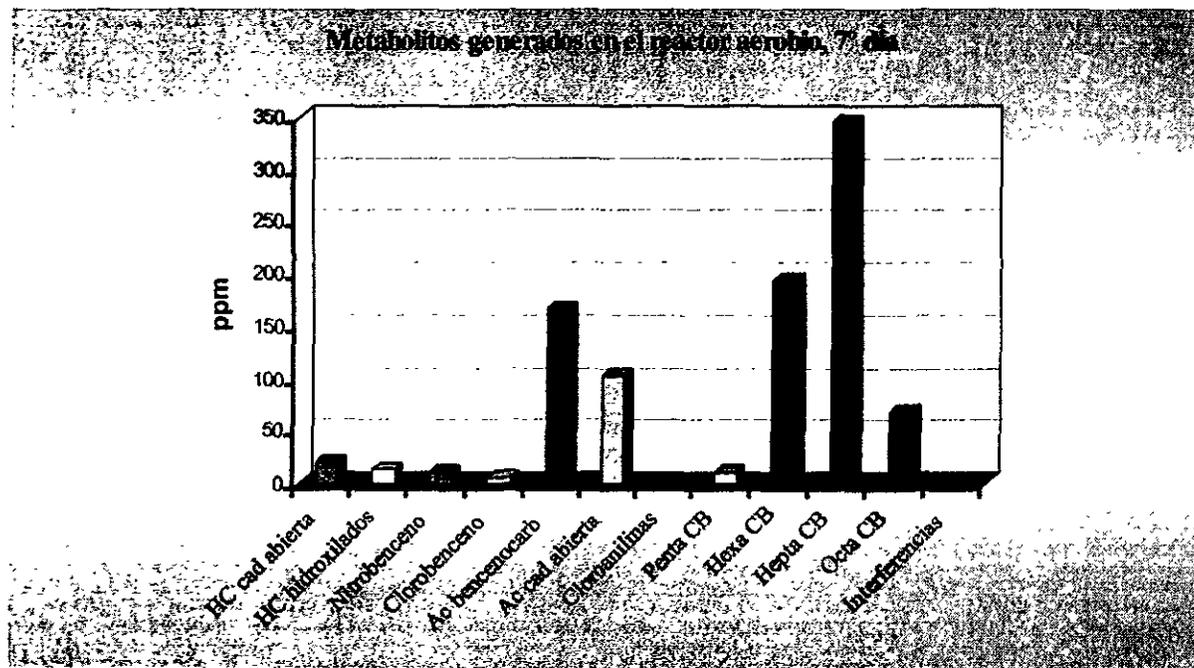


Fig. No.XIV-73.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 7º día.

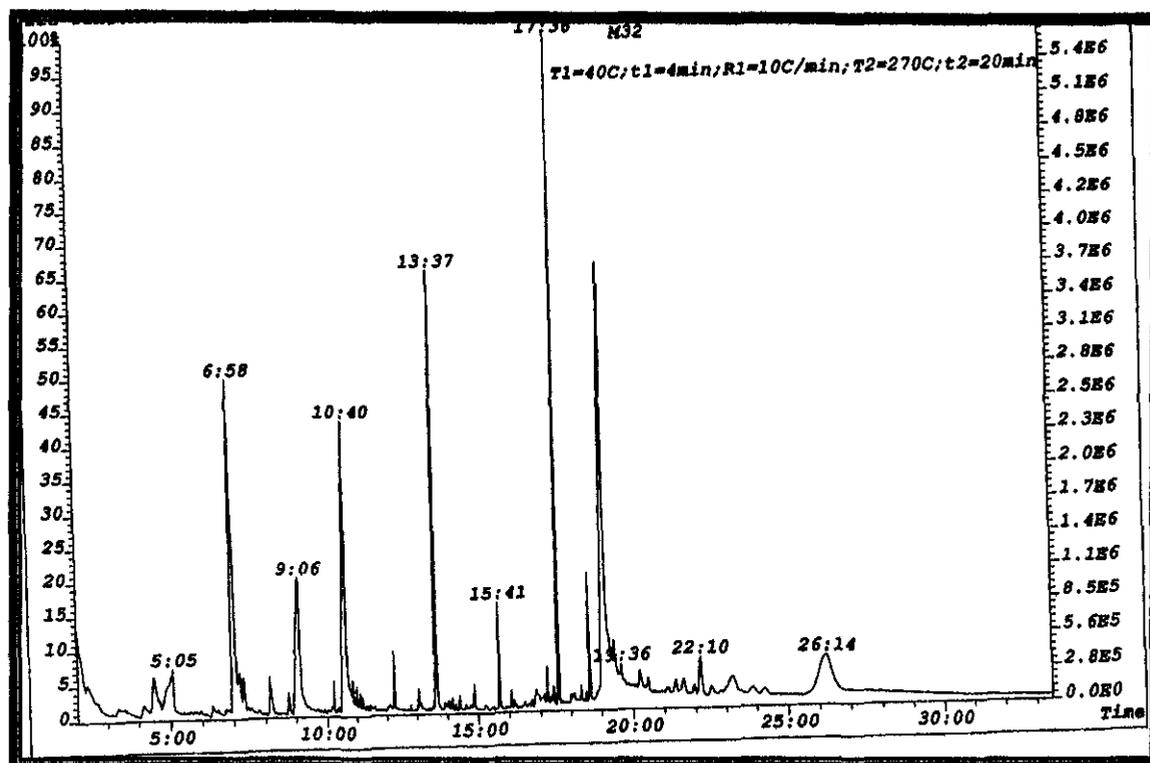


Fig. No. XIV-74.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 11° día
 Tabla No. XIV-40.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 11° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 11° día	
T. Retención	Compuesto
4:36	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano-1-ona
7:04	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano-1-ona
9:03	ácido octanoico
10:36	ácido nonanoico
12:17	tetradecano
13:40	ácido fosforico
14:56	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
15:17	nonadecan-amina- 10
15:44	ácido hexanodioico
16:07	heptadecano
17:16	tetratetracontano
17:39	ácido 1,2-bencendicarboxilico
18:39	phtalato bis(2-metoxietil)
19:27	nonadecano
20:32	hexatriacontano
21:25	33',44',55'-hexa CB
21:40	hexatriacontano
22:01	2,2',3,4',5',6-hexa CB
22:35	2,2',3,4',5',6-hexa CB
22:52	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB

23:57	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
26:14	acido phtalico

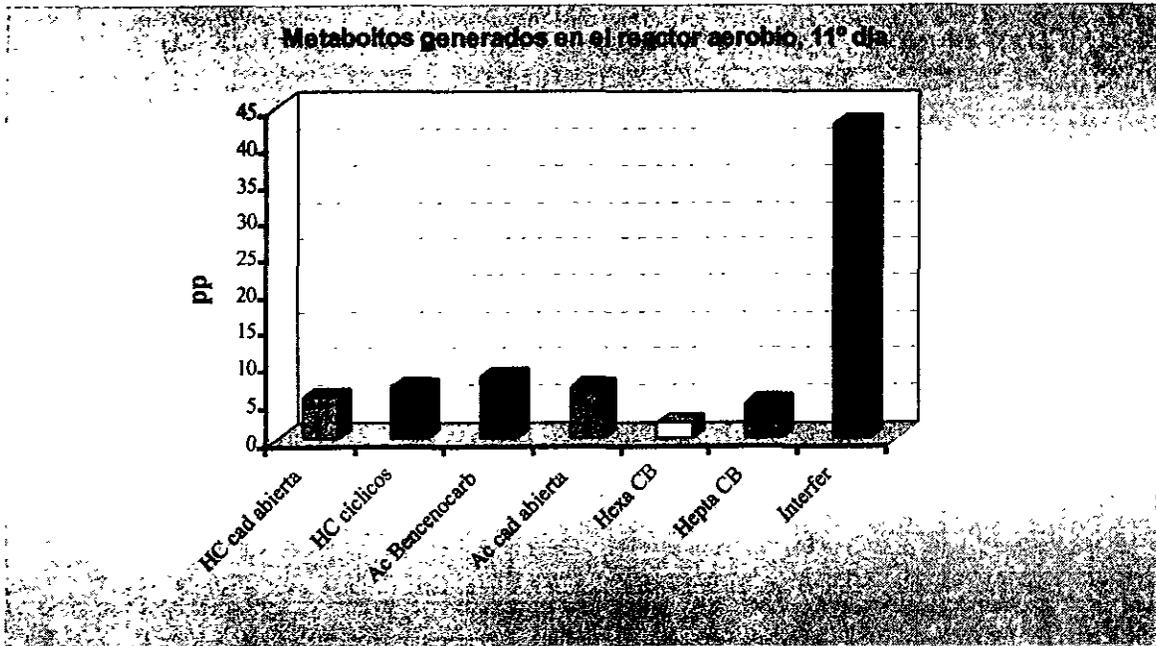


Fig. No.XIV-75.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 11° día.

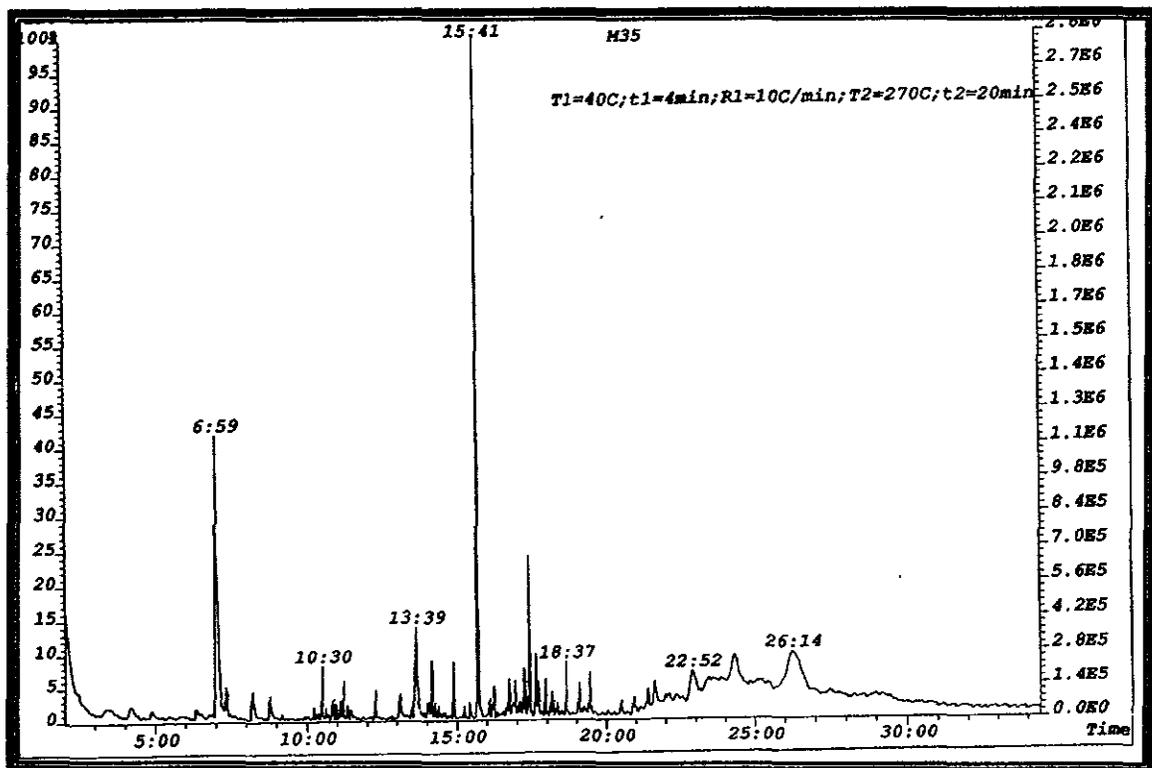


Fig. No. XIV-76 .- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 15° día

Tabla No. XIV-41.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 15° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 15° día	
T.Retención	Compuesto
6:59	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano-1-ona
8:12	1,2,4-triclorobenceno
8:46	1,2,4-triclorobenceno
10:14	2-etnil-1,3-dioxolano-4-metanol
10:30	tetracosano
10:52	2-butil-1-octanol
10:59	6-metil-1-etanol
11:07	1-fluoro-dodecano
11:13	nonadecano
11:20	2,6,11,15-tetrametil hexadecano
12:16	heptadecano
13:06	1,2,3-tricloro-4 nitrobenceno
13:34	tetracosano
13:39	tributil ester acido fosfórico
14:09	tetracosano
14:53	2,6,10,15-tetrametil heptadecano
15:41	bis(2-metil propil)ester ácido hexanodiódico
16:13	tetracosano
16:43	tetracosano
16:55	1-metil-3,5-bis(trimetil silil)oxibenceno
17:13	tetracosano
17:23	2,5-dimetil, ac. Bencenbutanoico
17:37	bis(2-metil propil)ester 1,2-ácido bencendicarboxílico
17:42	9,10-didehidro-19-norretinal
17:55	metili dinetris(oxi)tris-butano,1,1,1''
18:37	diisooctil ester 1,2-ácido bencendicarboxílico
19:04	tetracosano
19:26	2,6,10,15-tetrametil heptadecano
20:30	hexatriacontano
20:56	2,6,11,15-tetrametil hexadecano
21:23	2,2',3,4,4',5'-hexa CB
21:38	tritetracontano
22:52	3,5,24-trimetil-tetracontano
24:18	2,2',3,4,4',5,6-Hepta CB
26:14	bis (tridecil) ester 1,2-ácido bencendicarboxílico

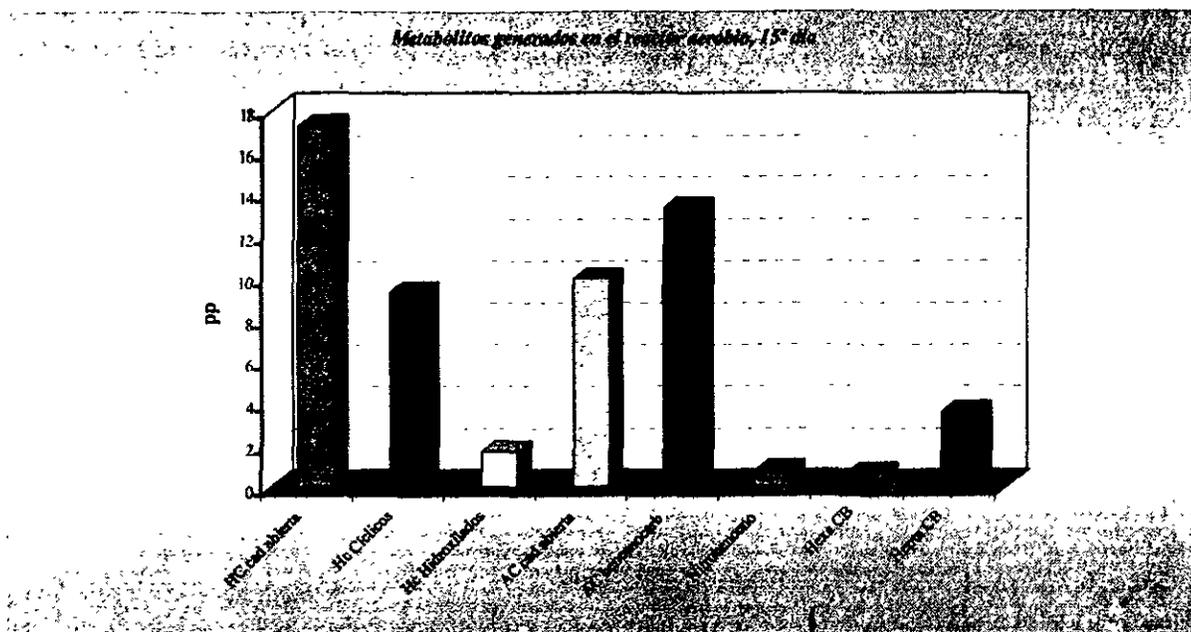


Fig. No.XIV-77.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 15 día.

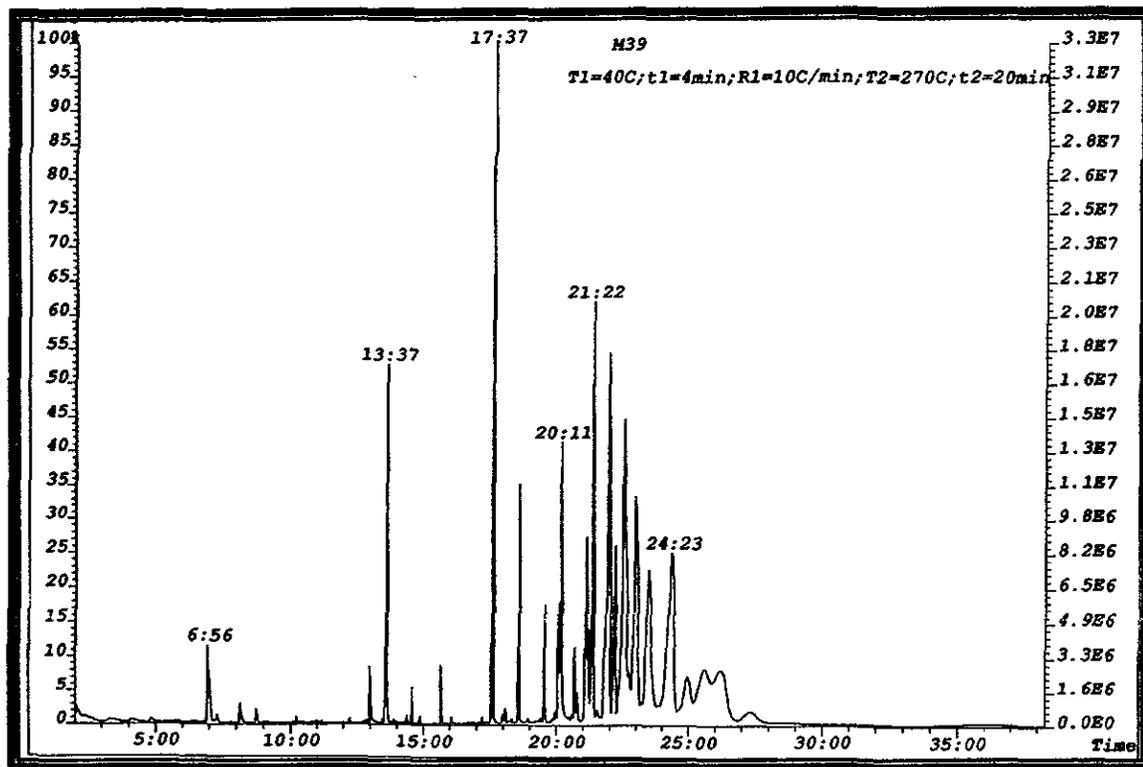


Fig. No. XIV-78.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 21° día

Tabla No. XIV-42.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 21° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 21° día	
T.Retención	Compuesto
4:50	Dodecano
6:56	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano-1-ona
7:18	3-(4-clorofenil)-3-butenil-oxi-trimetil-silano)
8:07	1,2,3-triclorobenceno
8:43	1,2,3-triclorobenceno
10:12	1,1-dietoxi-pentano
12:14	n-hexatriacontano
12:52	1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno
13:00	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:07	ciclo dodecano
13:13	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:28	tributil ester ácido fosfórico
13:37	2,4,6-tricloroanilina
14:23	dietil ftalato
14:35	2,6,7-trimetil decano
14:51	n-hexatriacontano
15:39	bis(2-metil propil)ester ácido hexanodióico
16:04	tritetracontano
17:13	tetracontano
17:37	bis(2-metil propil)1,2-ácido bencendicarboxílico
17:58	hexadecanol-1
18:06	butil-octil- ester-1-ácido bencendicarboxílico
18:36	ester butil glicolato ácido ftálico
19:33	2,2',4,4',6-penta CB
20:05	2,3,4',5,6-penta CB
20:11	1-nonadeceno
20:42	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
21:07	2,2',3,4,5,5'-hexa CB
21:11	2,2',3,4,5,5'-hexa CB
21:22	2,2',3,4,5,5'-hexa CB
21:58	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
22:11	2,3,3',4,4',5,6'-hepta CB
22:32	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
22:58	2,2',3,3',5,5',6-hepta CB
23:28	2,2',3,3',5,5',6-Hepta CB
24:23	2,2',3,3',5,5',6-hepta CB
24:59	2,2',3,3',5,5',6-hepta CB
25:38	2,2',3,3',4,4',5,5'-octa CB
26:16	bis(2-etilhexil) ftalato
27:17	2,2',3,3',4,4',5,5'-octa CB

Fig. No. XIV-80 .- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 27° día

Tabla No. XIV-43.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 27° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 27° día	
T. Retención	Compuesto
7:05	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano
7:26	(2-etoxi)ácido acético
8:17	1,2,3-triclorobenceno
8:52	1,3,5-triclorobenceno
10:19	2,5-dihidro-2,5-dimetoxi-furano
10:57	4-metil-2-undecano
11:04	tridecano
11:12	1,1,3,4-tetrametil-ciclopentano
12:20	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
13:06	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:41	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno
14:41	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno
14:56	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
15:45	bis(2-metilpropil)ester ácido hexanodióico
16:09	heptadecano
17:18	hexatriacontano
17:30	miristato isopropil
17:39	1,2-ácido bencendicarboxílico
18:23	pentadecano
18:41	bis(2-metoxietil) ftalato
19:28	nonadecano
20:32	octacosano
21:27	2,2',3,3',4,4'-hexa CB
21:40	hexatriacontano
22:00	2,2',3,4,4',5'-hexa CB
22:35	2,2',3,4,4',5'-hexa CB
22:53	hexatriacontano
23:02	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
23:59	ácido hexanodióico
24:20	Tricosano
26:19	diioctilester-1,2-ácido bencendicarboxílico

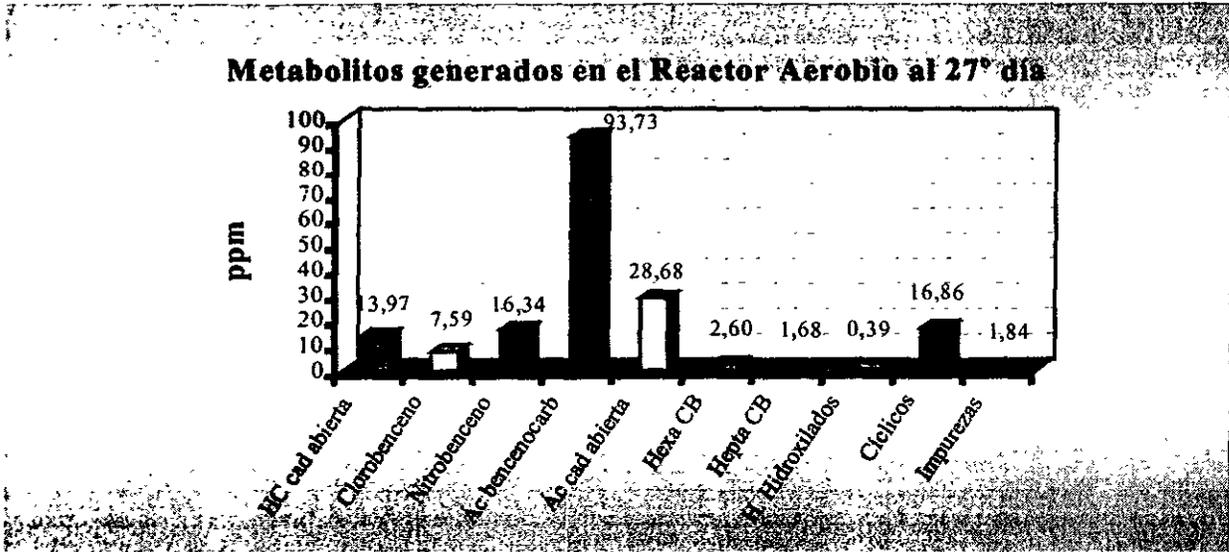


Fig. No.XIV-81.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 27° día.

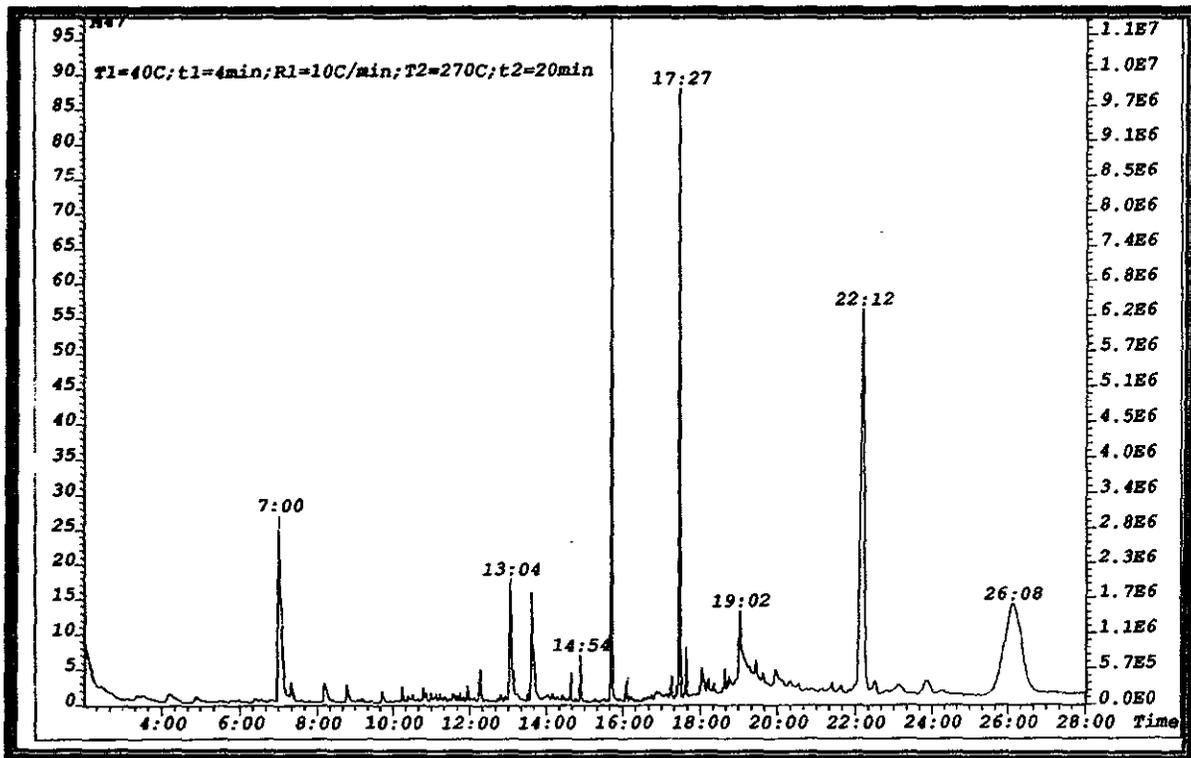


Fig. No. XIV-82.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 32° día

Tabla No. XIV-44.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 32° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 32° día	
T. Retención	Compuesto
7:00	3,5,5-trimetil-2-ciclohexanona
7:20	3-(4-clorofenil)-3-butenil-oxi-trimetil silano
8:11	1,3,5-triclorobifenilo
7:47	1,2,3-triclorobifenilo
10:15	trans-4-hidroxi-3-metil ac. undecanoico lactona
10:48	hexatriacontano
11:57	2,6,11-trimetil-dodecano
12:17	hexatriacontano
13:04	hexatriacontano
13:37	1,2,3-tricloro-4-nitrobenzono
14:39	1,2,3-tricloro-4-nitrobenzono
14:54	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
15:42	bis(2-metilpropil)ester ác. hexanodióico
16:06	tetradecano
17:15	tritetracano
17:27	isopropil miristato
17:38	bis(2-metilpropil)ester-1,2-ác. bencendicarboxílico
18:02	1-pentadecanol
18:38	butiloxil ester-1,2-ác. bencendicarboxílico
19:02	ácido hexadecanoico
19:27	tetradecano
21:24	2,2',3,4',5',6'-hexa CB
21:38	tritetracano
22:12	bis(2-metoxifenil)disulfuro
22:30	bis-1,benzotiofenbenzo
23:07	ácido oléico
23:50	bis(2-etilhexil)ester ácido hexanodióico
24:16	2,2',3,4',5',6'-hepta CB
26:08	Diisopentil ester-1,2-ác. Bencendicarboxílico

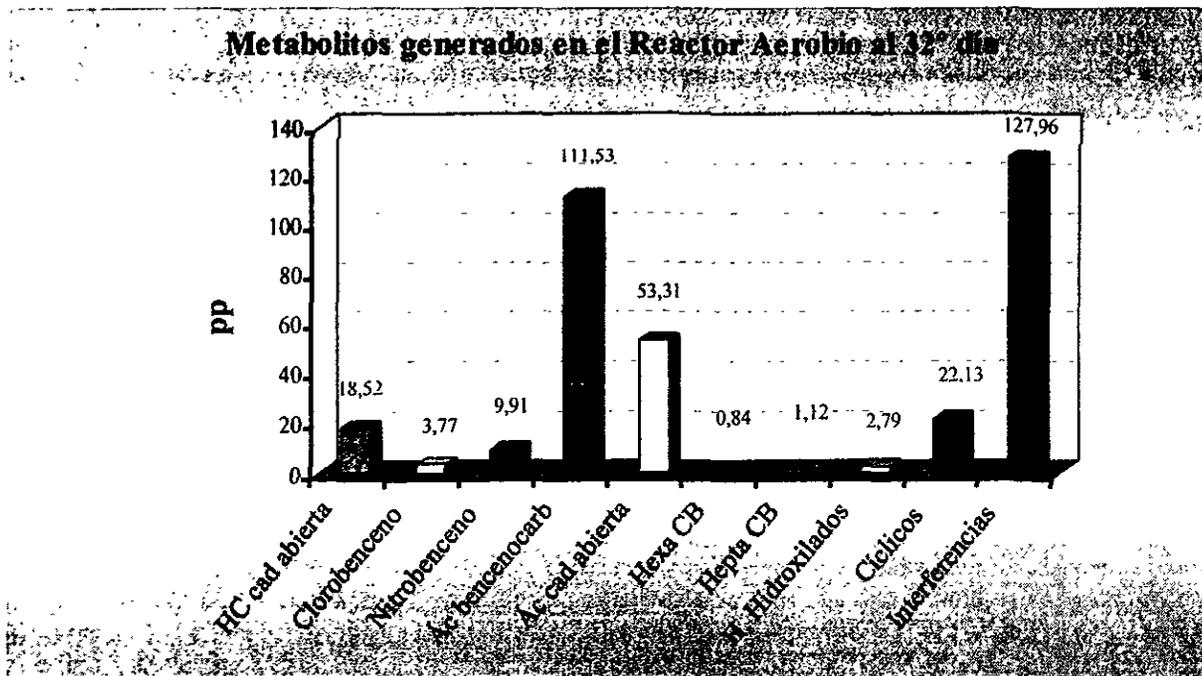


Fig. No.XIV-83.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 32° día.

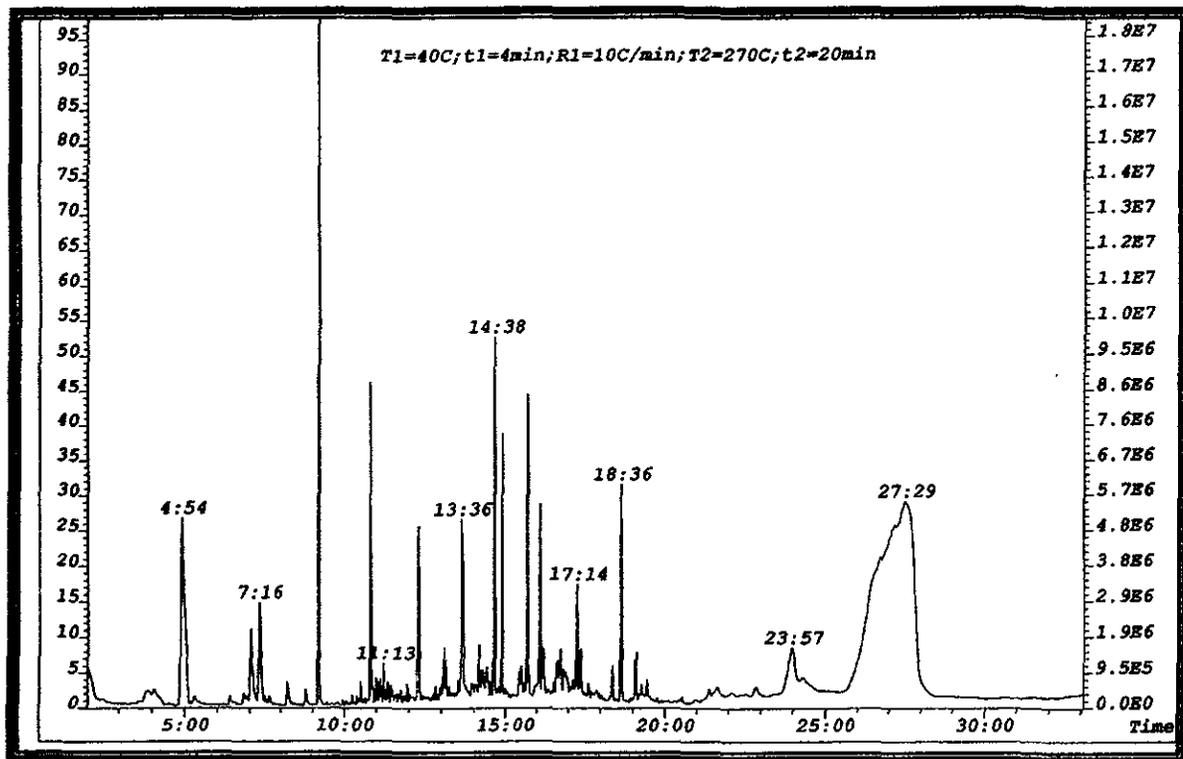


Fig. No. XIV-84.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 37° día

Tabla No. XIV-45.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 37° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 37° día	
<i>T. Retención</i>	<i>Compuesto</i>
4:54	Decano
6:59	3,5,5-trimetil-2-ciclohexeno-1-ona
7:16	Decano
8:10	1,3,5-triclorobenceno
8:46	1,2,3-triclorobenceno
9:11	Dodecano
10:30	11-decil-tetracosano
10:47	Hexadecano
11:13	Tetradecano
12:16	Tetradecano
13:03	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:36	2,5-dimetil-tetradecano
14:38	2-metil,1-(1,1-dimetil)etil-2-metil-1,3-propanedil ester ác. Propanóico
14:53	Hexadecano
15:30	2-metil-hexadecano
15:41	bis(2-metilpropil)ester ácido hexanodióico
16:05	Tetratetracontano
17:14	Pentatriacontano
17:20	Tetratetracontano
18:21	Pentatriacontano
18:36	dibutil ftalato
19:04	4-hidroxi-4metil ciclohexanona
19:26	Tetratetracontano
23:57	diocetil ester ácido hexanodióico
27:29	bis(2-etilhexil) ftalato

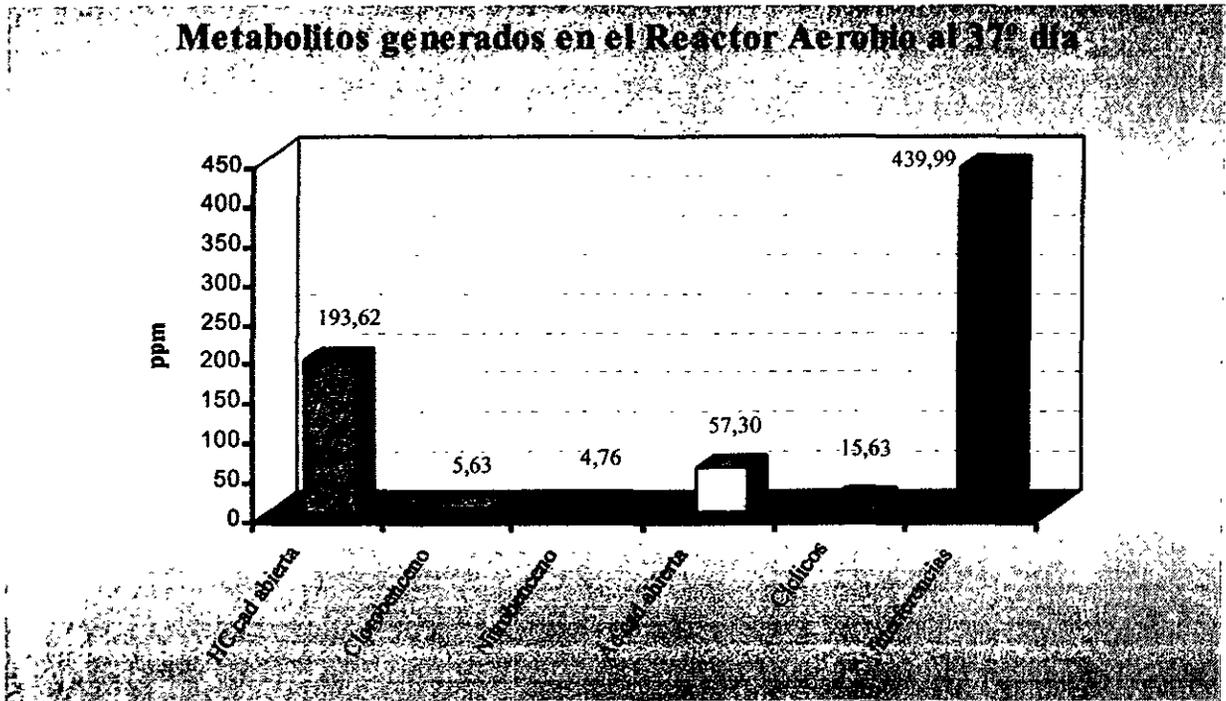


Fig. No.XIV-85.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 37° día.

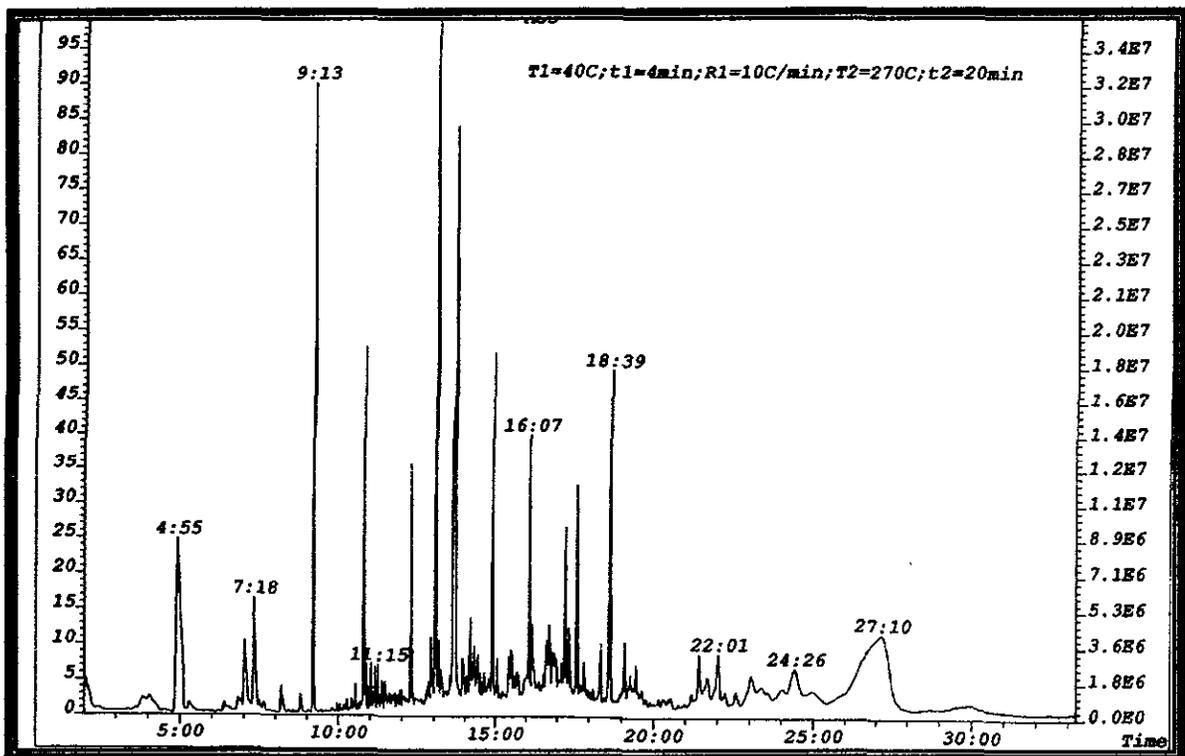


Fig. No. XIV-86.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 45° día

Tabla No. XIV-46.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor aerobio al 45° día.

Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 45° día	
T. Retención	Compuesto
4:55	decano
7:01	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano-1-ona
7:18	undecano
8:11	1,2,3-triclorobenceno
9:13	dodecano
10:54	2-hexil-1-decanol
11:01	2-butil-1-octanol
11:09	tridecano
11:15	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
12:16	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
12:54	1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno
13:05	1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno
13:41	tris(2-etil hexil)ester ácido fosfórico
14:11	9-ciclohexil-eicosano
14:55	hexadecano
16:07	heptadecano
16:12	2,6,10,14-tetrametil-pentadecano
16:45	15,19-dimetil-tritriacontano
17:16	1-hexil-3-metil-ciclopentano
17:22	2,6,10,14-tetrametil-hexadecano
17:38	bis(2-metilpropil)ester-1,2-ácido bencendicarboxílico
18:23	Hexatriacontano
18:39	dibutil ester ác bencendicerboxílico
19:06	2,5-heptadecadión
21:25	2,2',3,4',5',6-hexa CB
21:40	Tritetracontano
22:01	2,2',3,4',5',6-hexa CB
23:03	2',3,4,4',5,6-hepta CB
24:26	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
27:10	diisoptilester-1,2- ácido bencendicarboxílico

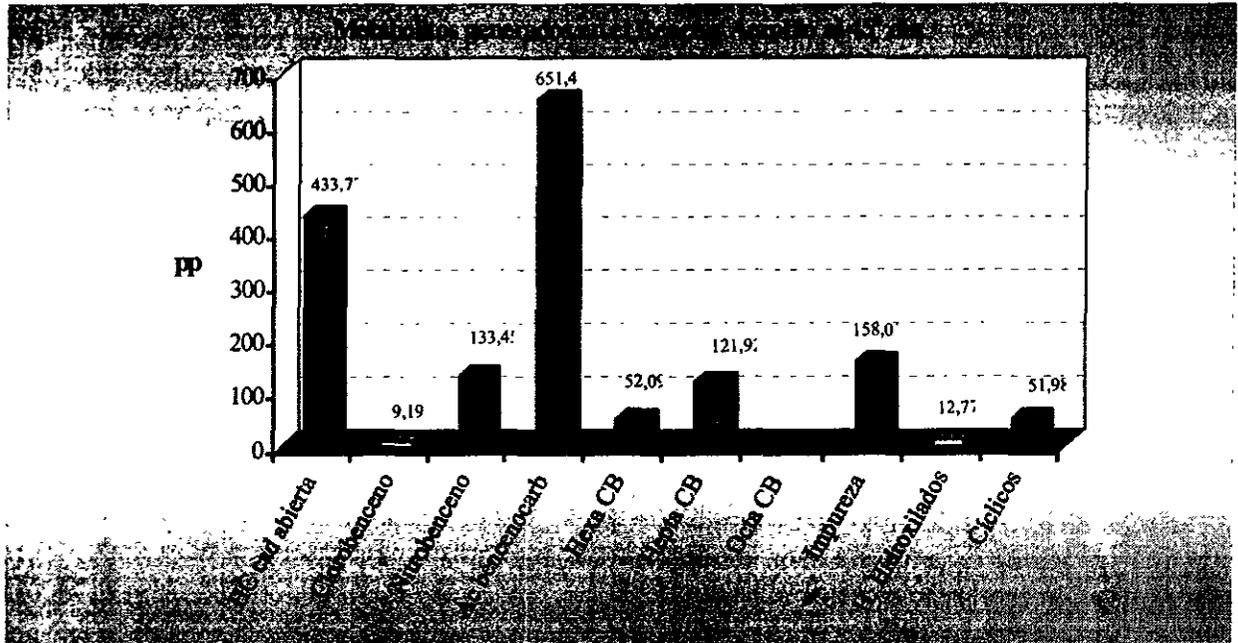
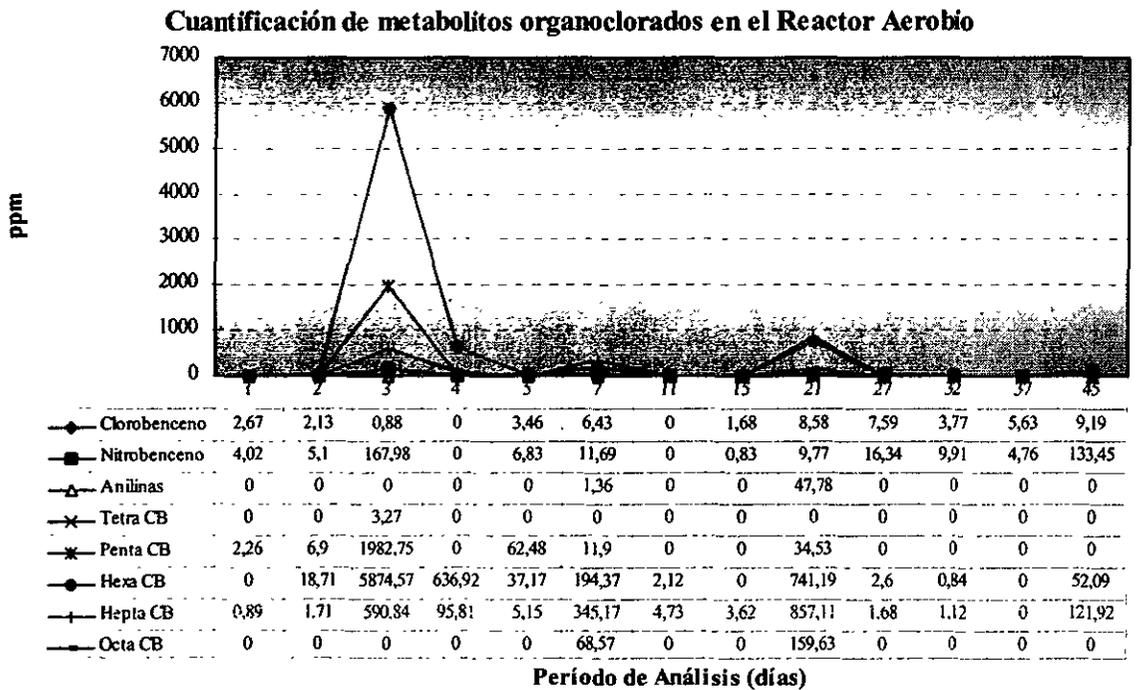


Fig. No. XIV-87.- Metabolitos generados en el Reactor Aerobio al 45° día.

Fig. No. XIV-88.- Cuantificación de los metabolitos generados en el Reactor Aerobio durante el período de tratamiento.



14.18. RENDIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN AEROBIA.-

La biodegradación de la mayoría de los congéneres de BPC en el reactor aerobio, ha alcanzado un buen rendimiento considerando un período 45 días de tratamiento introduciendo 20 ml de BPC aminado a una concentración inicial de 13011.92 ppm pentaclorobifenilos, 137805.71 ppm de hexaclorobifenilos y 329494.91 ppm de heptaclorobifenilos y obteniendo 8 ml de PCB aun sin ser biodegradado (en interior de las membranas) y una concentración de 52.09 ppm de hexaclorobifenilos y 121,92 ppm de heptaclorobifenilos en el medio mineral (1.7 L) en el recipiente del reactor. Los tetra y pentaclorobifenilos han sido biodegradados en su totalidad.

De esta manera, el rendimiento del proceso de biodegradación aerobia de los BPCs que no habían sido aminados es del 59.9 % para los pentaclorobifenilos, 56.78 % para los hexaclorobifenilos y 56.85 % para los heptaclorobifenilos. Para los octaclorobifenilos no ha sido posible realizar el rendimiento ya que inicialmente no ha sido posible su cuantificación inicial.

Ahora bien, considerando como promedio un 58 % del rendimiento anterior y estimando que un 90% de los BPCs aminados son biodegradados en el mismo proceso, el rendimiento neto de biodegradación en el reactor aerobio es 85.35 %.

Metabolitos Organoclorados Generados en el Reactor Aerobio			
1° día	2° día	3° día	4° día
1,2,4-triclorobenceno	1,2,4-triclorobenceno	1,2,4-triclorobenceno	22', 34, 55'-hexa CB
1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	22', 44', 66'-hexa CB
23,3'4',6-penta CB	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno	1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno	22', 34, 4'5, 6-hepta CB
22', 34, 45'-hexa CB	22', 44', 6-penta CB	22', 56-tetra CB	22', 34, 56, 6'-hepta CB
22', 33', 44', -hexa CB	22', 44', 5-penta CB	22', 44', 6-penta CB	
33', 44', 55'-hexa CB	22', 33', 44'-hexa CB	23', 44', 5-penta CB	
23, 3'4', 55', 6-hepta CB	22', 34, 4'5'-hexa CB	33', 44', 55'-hexa CB	
22', 33', 55', 6-hepta CB	33', 44', 55'-hexa CB	22', 34, 55'-hexa CB	
22', 34, 4'5, 6-hepta CB	22', 34, 4'5, 6-hepta CB	22', 34, 4'5'-hexa CB	
22, 3'4, 4'5, 5'-hepta CB	22', 33', 55', 6-hepta CB	22', 44', 66'-hexa CB	
	23, 3'4', 55', 6-hepta CB	22', 34, 56, 6'-hepta CB	
	22', 33', 45', 66'-octa CB	22', 34, 4'5, 6-hepta CB	
		22', 33', 44', 55'-octa CB	
		22', 33', 44', 56'-octa CB	
5° día	7° día	11° día	15° día
1,2,4-triclorobenceno	1,2,3-triclorobenceno	33', 44', 55'-hexa CB	1,2,4-triclorobenceno
1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	22', 34, 5'6-hexa CB	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno	22', 34, 4'5, 6-hepta CB	22', 34, 4'5-hexa CB
22', 45, 6'-penta CB	2,3,4-tricloroanilina		22', 34, 4'5, 6-hepta CB
22', 3'4, 6-penta CB	22', 44', 6-penta CB		
22', 33', 44'-hexa CB	22', 33', 5-penta CB		
33', 44', 55'-hexa CB	22', 33', 46'-hexa CB		
22', 44', 66'-hexa CB	22, 34', 56-hexa CB		
22', 33', 55', 6-hepta CB	22', 33', 55', 6-hepta CB		
22', 3'4', 55', 6-hepta CB	22', 34, 4'5, 6-hepta CB		
22', 33', 44', 55'-octa CB	22', 33', 44', 55'-octa CB		
	22', 33', 44', 56'-octa CB		
21° día	27° día	32° día	37° día
1, 2,3-triclorobenceno	1,2,3-triclorobenceno	1,3,5-triclorobenceno	1,3,5-triclorobenceno
1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno	1,3,5-triclorobenceno	1,2,3-triclorobenceno	1,2,3-triclorobenceno
1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno

2,4,6-tricloroanilina	1,2,5-tricloro-2-nitrobenzono	22', 34', 5'6-hexa CB	
22', 44', 6-penta CB	22', 33', 44'-hexa CB	22', 34', 4'5, 6-hepta CB	
23, 4'5,6-penta CB	22', 34, 4'5-hexa CB		
33', 44', 55'-hexa CB	22', 34, 4'5,6-hepta CB		45° día
22', 34, 55'-hexa CB			1,2,3-triclorobenceno
23,3'4, 4'5',6'-hepta CB			1,2,4-tricloro-5-nitrobenzono
22', 33', 55', 6-hepta CB			22', 34', 5'6-hexa CB
22', 33', 44', 55'-octa CB			2'3, 44', 5'6-hexa CB
			22', 34,45',6-hepta CB

Tabla XIV-47.- Metabolitos organoclorados generados en el reactor aerobio durante todo el período de tratamiento

Como se observa, la tabla XIV-48 muestra los resultados obtenidos de la comparación de las tablas XIV-47 (congéneres de BPCs que permanecen entre los metabolitos organoclorados en el reactor aerobio) y XIV-34 (congéneres de BPCs que fueron introducidos al reactor). En la tabla se observa que los isómeros 53 y 100 de los tetra y pentaclorobifenilos son detectados en el medio al 1° y 5° día pero son degradados completamente en los días sucesivos del tratamiento. Sin embargo, durante este período de tiempo aparecen en el medio los isómeros: 99, 98, 103, 102, 97, y 83 de los pentaclorobifenilos, probablemente como productos de dechloración, pero de igual manera, tienden a ser degradados durante todo el período posterior de tratamiento.

De los hexaclorobifenilos, los isómeros 129,153,149, 137 y 155 permanecen en el medio durante varios días del período de tratamiento. Aparecen además, los isómeros 141, 169, 137, 147 y 168 como productos de dechloración. De éstos, los isómeros 155 y 169 son degradados al 2° y 5° día de tratamiento no detectándose en los días sucesivos de tratamiento.

Los isómeros 181 y 185 de los heptaclorobifenilos permanecen en el medio durante varios días del tratamiento, el segundo de ellos (185) es degradado al 5° día de tratamiento y no es detectado nuevamente; sin embargo los isómeros 178, 183, 185, 186, 189 y 191 son detectados en el medio como productos de dechloración, éstos tienden a ser degradados en durante el transcurso del tratamiento.

De los isómeros octaclorobifenilos los números 194 y 195 permanecen en el medio y aparecen los isómeros 199 y 196 en el medio que son también dechlorados durante todo el período posterior de tratamiento.

Congéneres de BPCs que permanecen en el medio							
Tetraclorobifenilo	No. IUPAC	Hexaclorobifenilo	No. IUPAC	Heptaclorobifenilo	No. IUPAC	Octaclorobifenilo	No. IUPAC
22', 56-CB	53	22',33',44'-CB	129	22', 3'4', 55', 6-CB	185	22',33',44',56-CB	195
		22',44',55'-CB	153	22', 34, 45', 6-CB	181	22',33',44', 55'-CB	194
Pentaclorobifenilo	IUPAC	22',34',5'6-CB	149				
22',44', 6-CB	100	22',34,4'5-CB	137				
		22', 44', 66'-CB	155				
Congéneres de BPCs formados como productos de dechloración							
Pentaclorobifenilo	No. IUPAC	Hexaclorobifenilo	No. IUPAC	Heptaclorobifenilo	No. IUPAC	Octaclorobifenilo	No. IUPAC
22',44',5'-CB	99	22', 34,55'-CB	141	23, 3'4, 4',55'-CB	189	22', 33', 45, 66'-CB	199
22', 3'4',6-CB	98	33', 44', 55'-CB	169	22', 33', 55', 6-CB	178	22', 33', 44', 56-CB	196
22, 4'5, 6-CB	103	22', 34, 4'5-CB	137	22', 3'4,4'5,5'-CB	189		
22', 45, 6-CB	102	22', 34', 56-CB	147	22', 34, 56, 6'-CB	186		
22', 3'4, 6-CB	97	23, 44', 5'6-CB	168	23, 3'4, 4'5', 6-CB	191		
22', 33', 5-CB	83			22', 34, 45',6-CB	183		

Tabla No. XIV-48.- Congéneres de BPCs que permanecen en el medio y productos de dechloración generados en el reactor aerobio.

Resulta difícil realizar el análisis comparativo de los resultados obtenidos en la presente investigación con los registros realizados por los diferentes autores, debido principalmente a que los trabajos de biodegradación aerobia reportados han sido realizados con isómeros de BPCs puros; además de las diferencias en las condiciones aplicadas en el desarrollo de la investigación.

Los resultados del presente trabajo confirman lo propuesto por Tiedje (1969), Ahmed (1973), Ohmori (1973), Furukawa (1979) y Sylvestre (1982) sobre la degradación de BPCs utilizando las cepas de *Achromobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Arthrobacter sp.* sin embargo, en los análisis de metabolitos generados del proceso de biodegradación aerobio en la presente investigación, no se detectaron los compuestos benzoatos y clorobenzoatos por ellos reportados.

Aunque existe un gran número de informes en la literatura (Furukawa, 1982; Kong, 1983; Sylvestre, 1985) referente a la degradación completa de los congéneres de BPCs de bajo número de cloros (mono a tetraclorados) existe muy poca información concerniente a la evaluación de la mineralización de congéneres altamente clorados (penta a octaclorados) en tratamientos con microorganismos aerobios; el problema de comparación de resultados se complica aun más debido a que la mayoría de los trabajos existentes sobre biodegradación de BPCs han sido realizados utilizando un solo congéneres de BPC y un solo tipo de microorganismo. En la presente investigación la biodegradación se realizó utilizando varias cepas de microorganismos y con una mezcla de congéneres incluso isómeros diferentes de penta, hexa, hepta y octaclorobifenilos con buenos resultados en comparación a los estudios de Yagi (1980), Baxter (1995) y Kong (1983) como se muestra a continuación:

Referencia	Tipo de BPCs	Concentración de BPC	Porcentaje de biodegradación
Yagi (1980)	Di-triclorobifenilos	0.05 % en peso	1º día 80%; 3º día 100%
		0.25% en peso	1º día 22%; 3º día 29%
	En co-metabolismo con bifenilos	41% en peso	2º día 70%; 6º día 80%
Baxter (1995); Kong (1983)	Aroclor® 1242	-----	80% en 3 semanas; 95% en 100 días
	Aroclor® 1216	-----	96% en 52 días
	En co-metabolismo con 4-clorobifenilo	-----	50% en 2 días
Hernández (1999)	Mezcla de congéneres	54 % en peso	85% en 45 días

Entre las principales enzimas involucradas en el proceso de biodegradación aerobio de los BPC aminados se encuentran las oxidasas, mooxidadas, y peroxidadas inferidas por los metabolitos encontrados en la determinación cromatográfica. No obstante, parece existir otro mecanismo de oxidación del anillo por enzimas nitrorreductasas y transaminasas; procesos que deben ser confirmados por estudios de enzimología del proceso.

De acuerdo a los estudios realizados por Bedard (1986 y 1987), sobre la ruta de biodegradación de los organismos procariotas realizada por medio de enzimas 2,3-dioxigenasas y las 5 reglas de biodegradación establecidas por Furukawa (1982); éstas son también válidas, al menos parcialmente en los resultados obtenidos de la presente investigación sobre la biodegradación utilizando la mezcla de diferentes microorganismos. Los metabolitos identificados como compuestos hidroxilados son diferentes a los reportados por tales autores lo

que sugiere la existencia de una red intrincada de rutas metabólicas. Debido posiblemente al cambio de las propiedades fisicoquímicas del PCB aminado; en el complejo enzimático involucrado en el proceso de biodegradación pueden existir también enzimas nitrorreductasas y aminosas que establecen en conjunto otras rutas metabólicas del PCB aminado.

Al parecer, algunos de los metabolitos generados en el proceso de biodegradación aerobio se realizan por el mecanismo de oxidación propuesto por Preston (1983) Selander (1975) y Bowman (1973) que involucra la inserción de un átomo de oxígeno dentro del enlace carbono-hidrógeno como lo han demostrado en la biodegradación por hidroxilación de congéneres tetraclorobifenilos y clorobenzenos.

Algunos de los metabolitos generados en el reactor aerobio son compuestos de tipo acetofenonas y derivados de ellos, similares a los reportados por Baxter (1984) en la biodegradación de diferentes congéneres con formación de ácidos hidroxio-oxo-clorofenilos, clorohexadienónicos y cloroacetofenonas. Por otra parte, ciertos metabolitos identificados pertenecen a los grupos butoxi y oxiácidos de cadena larga similares a los reportados por Eadsforth (1985) sobre la degradación de compuestos oxiarenos por enzimas hidrolasas epoxidas, aminohidrolasas, *L*-amino-acido-oxidasas y transaminasas; lo que infiere la existencia de enzimas similares en el proceso aerobio de esta investigación.

En la presente investigación, no ha sido posible realizar estudios de las rutas de biodegradación llevadas a cabo en el proceso de tratamiento. Sin embargo, los resultados obtenidos del análisis de los metabolitos generados proporcionan evidencias de la biodegradación de la molécula y aunque no ha sido posible comprobar la mineralización total por la determinación de la evolución de CO₂ generado durante el proceso debido a fugas por imperfecciones en el sello de la cámara del reactor en el momento de realizar la determinación de gases, los resultados obtenidos de la determinación de cloruros en el medio, representa indicios de la mineralización parcial en concordancia con lo establecido por los estudios de Fava (1991).

14.19. METABOLITOS GENERADOS EN EL REACTOR ANAEROBIO.-

Las tablas XIV-49 a la XIV-59 presenta los principales compuestos formados de la biodegradación del BPC aminado en el reactor anaerobio y sus respectivos tiempos de retención. Las figuras XIV-89 a la XIV-110 presentan los cromatogramas y gráficas correspondientes de los metabolitos generados en el reactor.

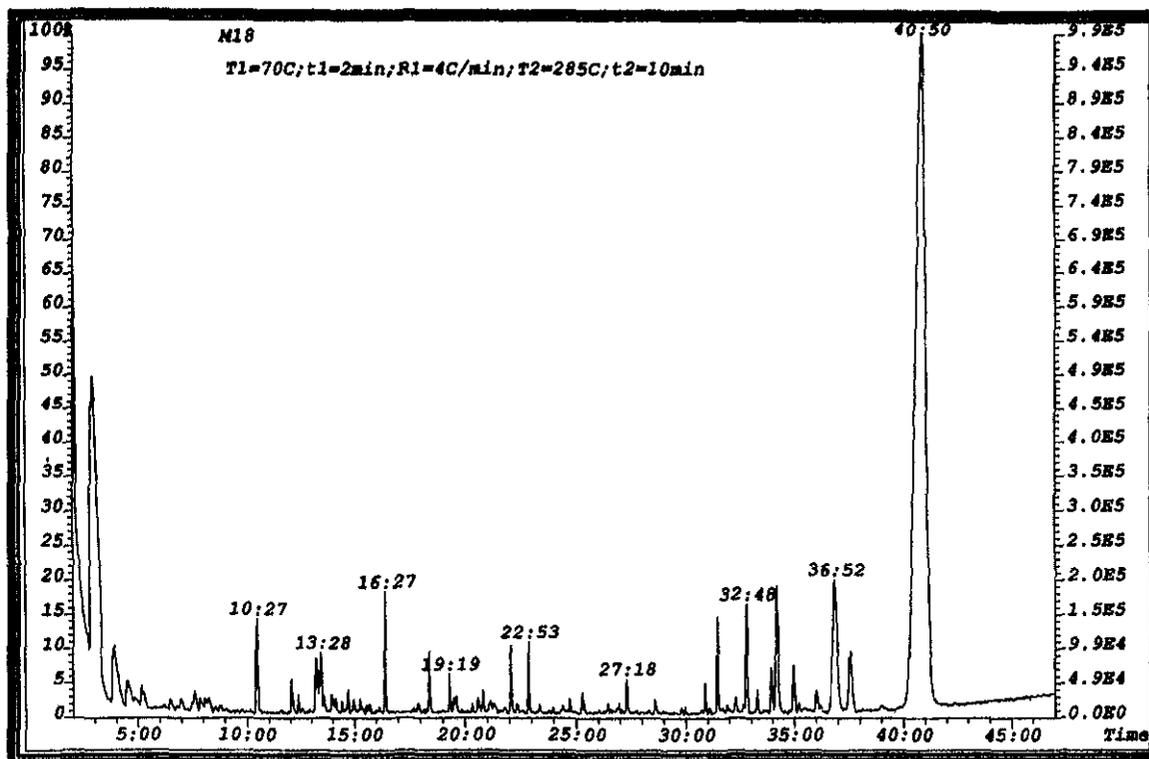


Fig. No. XIV-89.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 1° día.

Tabla No. XIV-49.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 1 día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 1° día	
T. Retención	Compuestos
3:53	1,2,4 triclorobenceno
10:27	Tridecano
12:03	1,2,4 tricloro-4-nitrobenceno
12:21	Tetracosano
13:14	2,3,4 tricloroanilina
13:28	Hexadecano
13:56	2,3,4 tricloroanilina
14:08	2,4,6 tricoloroanilina
14:26	2-butil 1-octanol
14:43	4,5 dimetil nonano
14:58	2-butil 1-octanol
15:16	4,5 dimetil nonano
16:27	2,6,10,15 tetrametil hetadecano
18:24	Ac. Adipico diisobutil ester (Ac. Hexadenoico 2 metil)
19:19	Tetracontano
19:37	2,7,10 trimetil decano
20:36	3 etil 2 metil hexano
20:49	4,5 dimetil nonano
22:04	hexatriacontano

22:53	Ac. 1,2 bencendicarboxílico diheptil ester
24:44	4,5 dimetil nonano
25:17	Ac. 1,2 bencendicarboxílico decil hexil ester
27:18	22', 44', 6 penta CB
28:36	23', 44', 5 penta CB
36:53	22', 33', 44' hexa CB
31:28	22', 33', 44' hexa CB
32:18	Einecosano
32:48	22', 44', 55' hexa CB
33:18	23, 3'4, 4'5, 5' hepta CB
33:57	22, 33', 44' hexa CB
34:12	bencil butil phtalato
34:59	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:02	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:52	bis (2-etil hexil) ester -Ac. hexadecanoico
37:36	23, 3'4', 55', 6 hepta CB
40:50	Ac. 2 bencendicarboxílico diisocetil ester

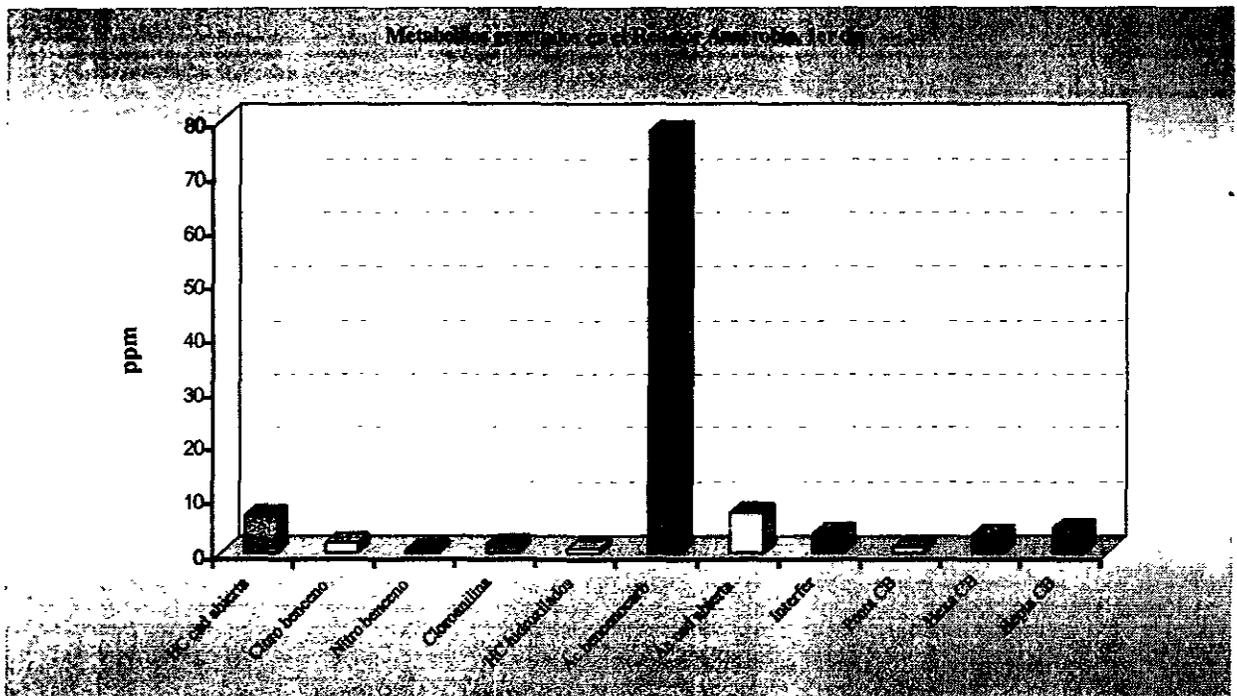


Fig. No.XIV-90.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 1º día.

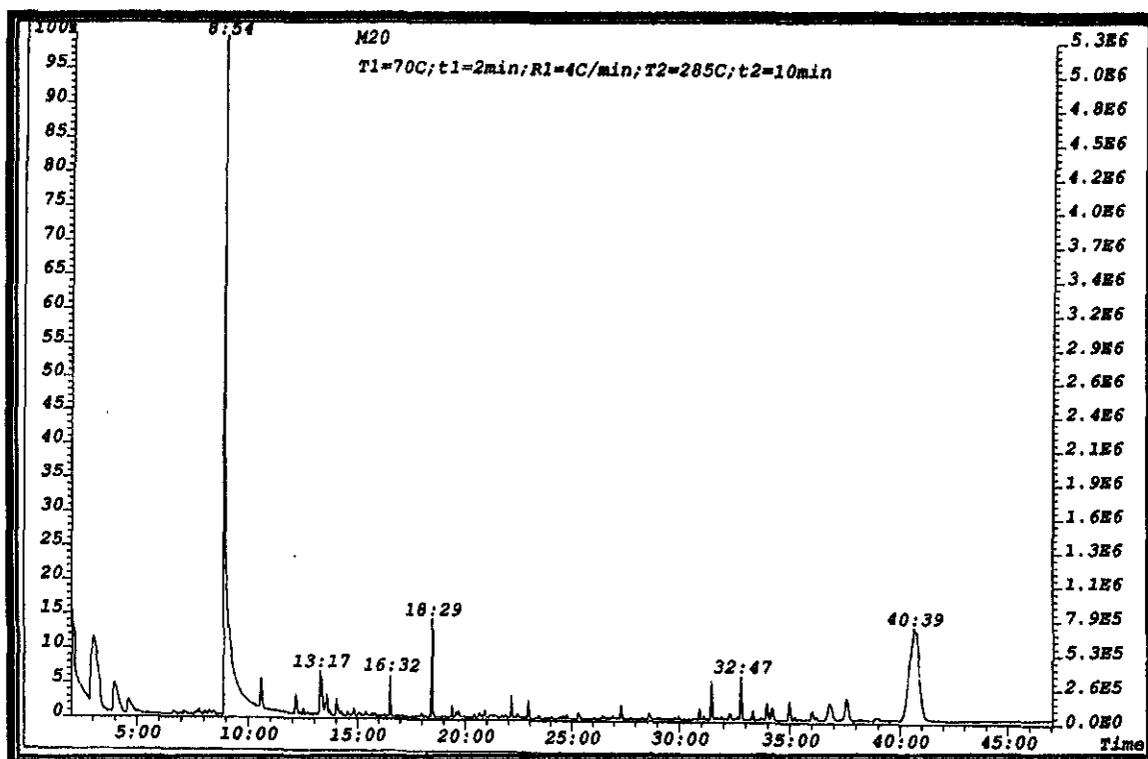


Fig. No. XIV-91.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 2° día.

Tabla No.XIV-50.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 2° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 2° día	
T. Retención	Nombre
3:59	1,2,4 triclorobenceno
10:35	heptadecano 2,6,10,15 tetrametil
12:09	1,2,3 triclor-4-nitrobenceno
13:17	2,3,4, tricloroanilina
13:32	hexadecano 2-metil
14:02	2,4,6 tricloroanilina
14:50	2,4,6 trimetil heptadecano
16:32	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
18:01	Hexatriacontano
18:29	Ac. Adipico (bis(2metilproil)ester ac. hexandioico)
19:24	Heptadecano
19:39	2,6 dimetildecano
20:55	4,5 diemtilnonano
22:09	4,5 diemtilnonano
22:55	bis(2metil propil)ester-ac.bencendicarboxilico
25:20	Ac. Bencendicarboxilico dodecil ester
27:20	23, 3'4',6 penta CB
28:36	23, 3'4', 6 penta CB
30:54	22', 33', 44', hexa CB

31:28	22', 34, 4'5'hexa CB
32:47	33', 44', 55', hexa CB
33:19	23, 3'4, 4'5, 5'hepta CB
33:58	22, 34, 4'5'hexa CB
34:14	bencil butil phtalato
34:59	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:02	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:49	Ac. Adipico (bis(2etil hexil) ester -ac.hexanodioico)
37:34	23, 3'4, 4'5, 5'hepta CB
40:39	Ac. 1,2 bencendicarboxilico diisocetil ester

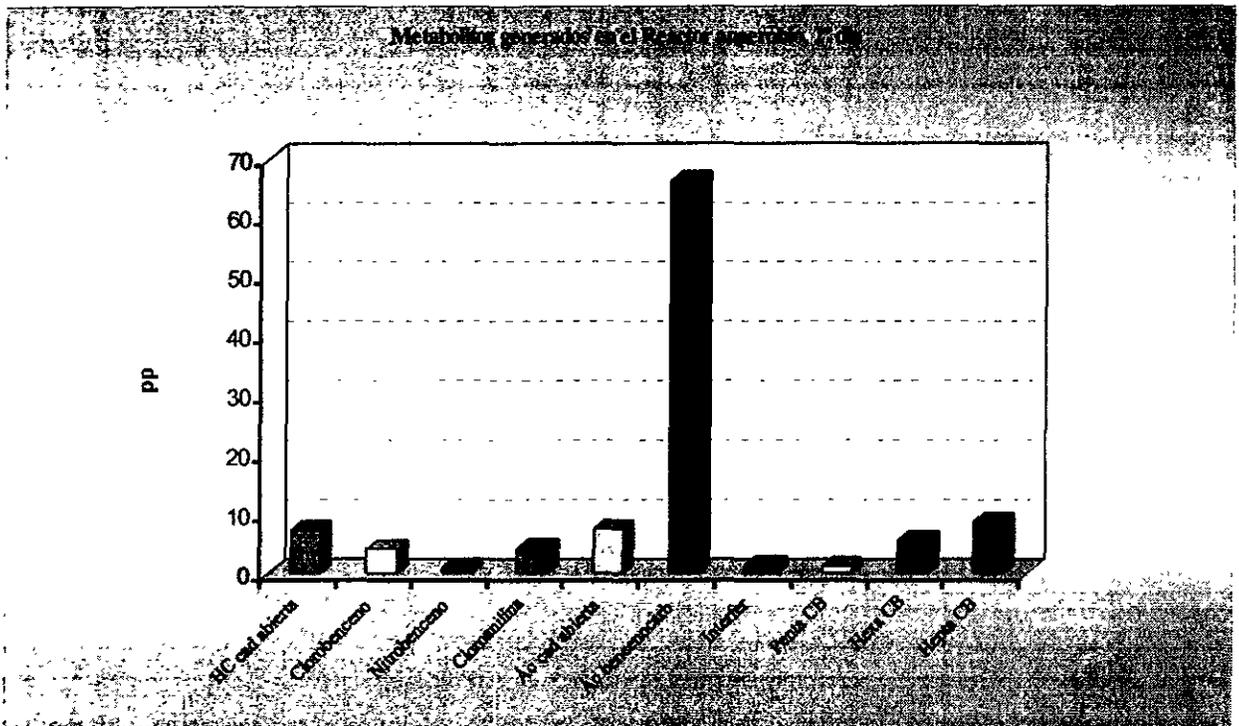


Fig. No.XIV-92.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 2º día.

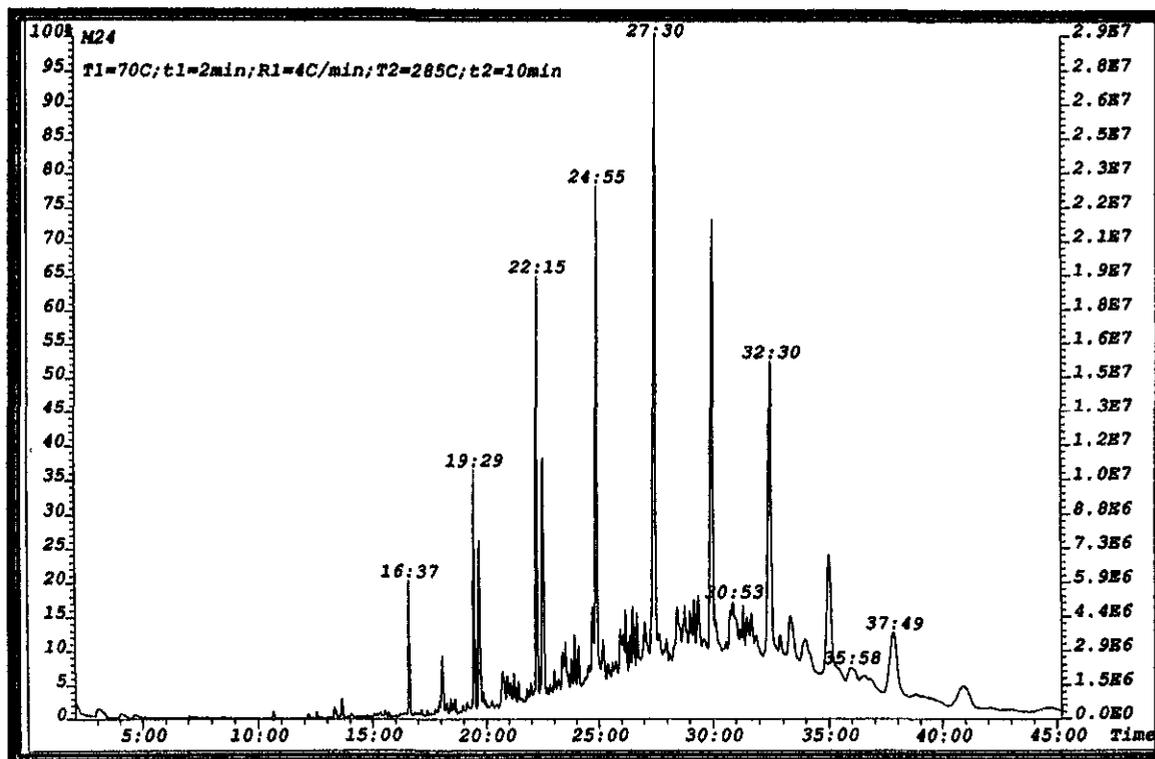


Fig. No. XIV-93.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 4° día.

Tabla No. XIV-51.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 4° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 4° día	
T. Retención	Compuesto:
4:03	1,3,5 triclorobenceno
10:39	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
12:11	1,3,5 tricloro-2-nitrobenceno
12:33	2,6,10,14 tetrametil heptadecano
13:19	2,4,6 tricloroanilina
13:40	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
14:04	2,3,4 tricloroanilina
15:22	Hexatriacontano
15:33	Hexatriacontano
15:44	Hexatriacontano
16:37	Hexadecano
18:05	2-metil tetradecano
18:26	2-metil hexadecano
18:38	Tetracontano
19:29	Hexatriacontano
19:43	2,6,10,14 trimetil pentadecano
20:45	1 cloro-octadecano
20:55	Tritetracontano
21:13	Tritetracontano

22:15	2,6,10,15 tetrametil heptadecano
22:33	2,6,10,14 tetrametil hexadecano
24:55	Hexatriacontano
27:30	[1-heptacosano]
30:01	Hexatriacontano
32:30	Tritetracontano
33:20	acetamida N-metil N-4-metoxi-4-hexahidropil butil
35:02	Tritetracontano
37:49	22', 34,4'5. 6 hepta CB
40:56	Hexatriacontano

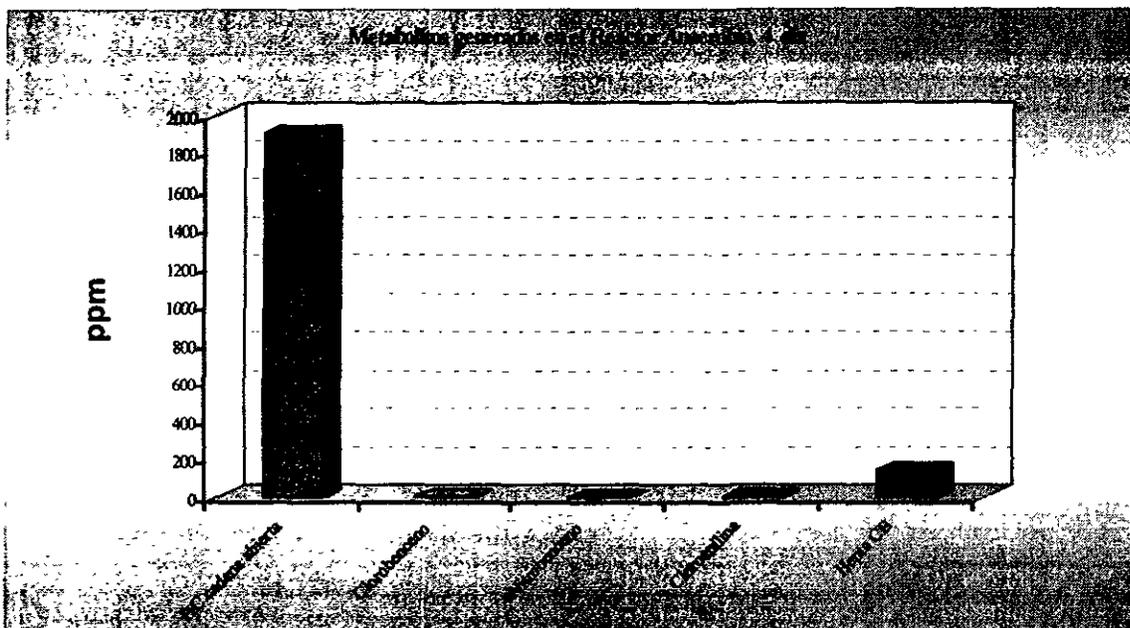


Fig. No.XIV-94.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 4° día.

28:38	23, 4'5, 6 penta CB
29:55	Hexadecano
30:04	22', 34, 4'5'hexa CB
30:18	23', 44', 6 penta CB
31:01	22', 33', 44'hexa CB
31:14	22', 34, 55'hexa CB
31:36	22', 44', 55'hexa CB
32:59	33', 44', 55'hexa CB
33:31	22', 33', 55', 6 hepta CB
34:13	33', 44', 55, 6 hepta CB
35:18	22', 33', 55', 6 hepta CB
36:25	22', 33', 55', 6 hepta CB
38:12	22', 33', 55', 6 hepta CB
39:37	22', 33', 55', 6 hepta CB
40:42	22', 33', 44', 56' octa CB
42:02	bis(e-tilhexil)phatalato

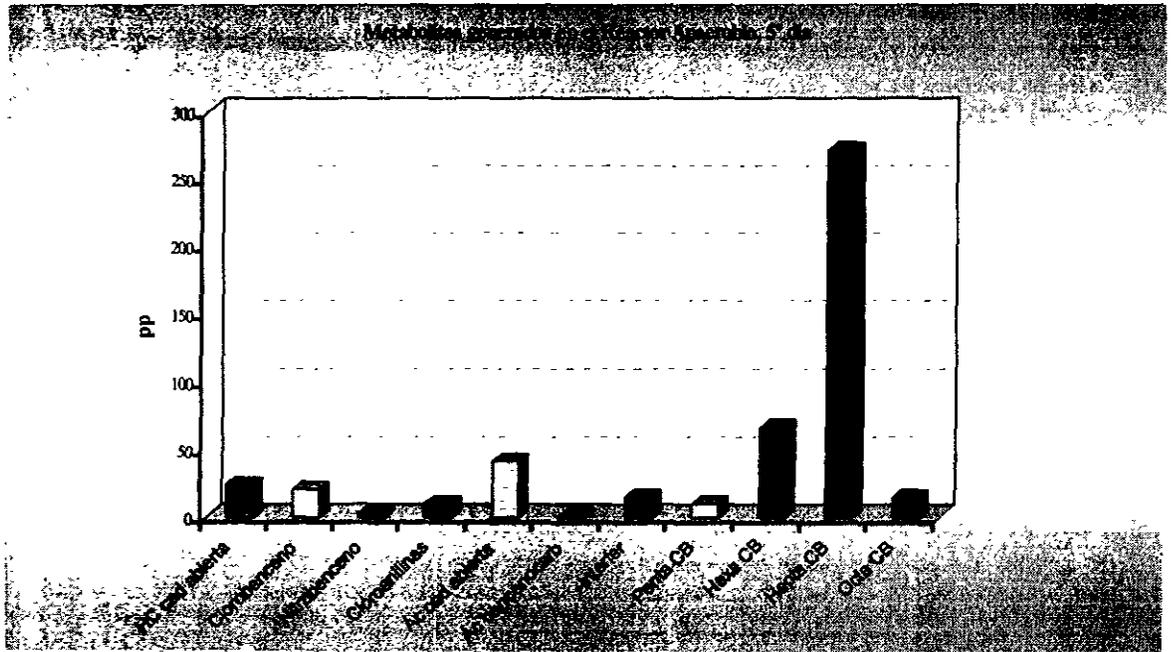


Fig. No. XIV-96.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 5° día.

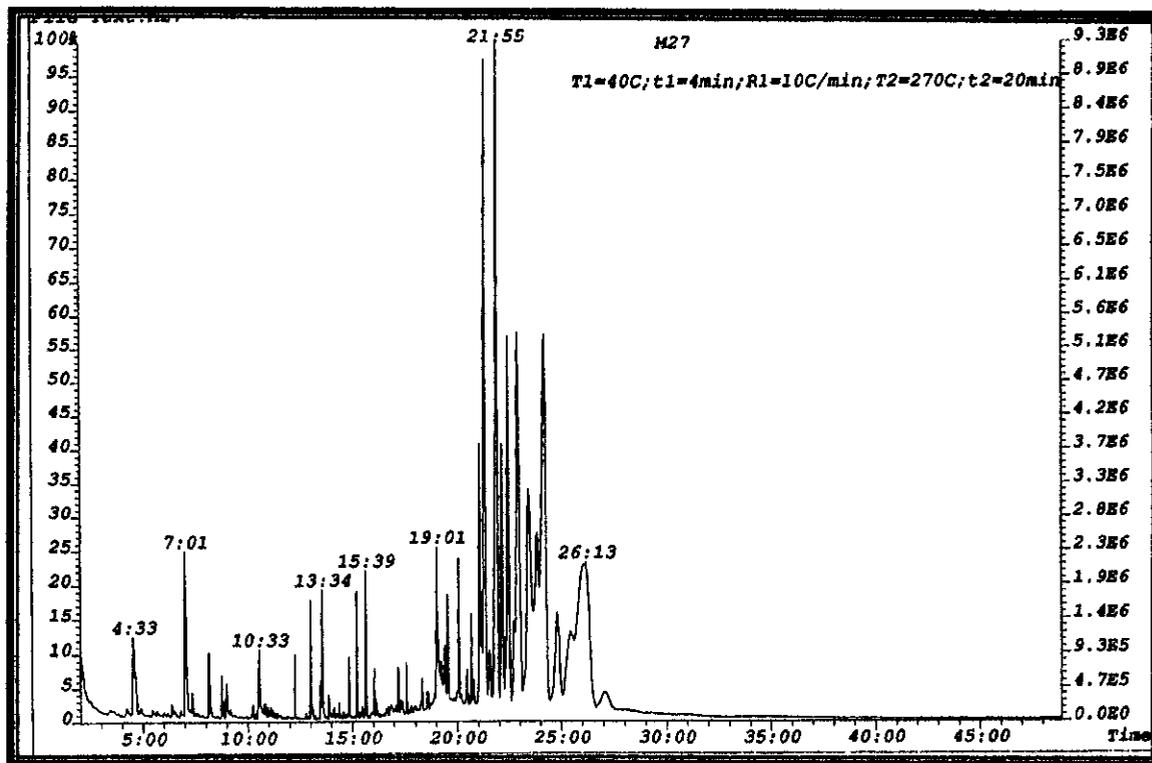


Fig. No.XIV-97.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 7° día.

Tabla No. XIV-53.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 7° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 7° día	
T. Retención	Compuesto
4:36	2,2,4,6,6-penta metil etano
7:02	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano-1-ona
7:23	2,4-dimetil-2,3-pentanodiol
8:10	1,2,3-triclorobenceno
8:46	1,2,3-triclorobenceno
9:02	ácido octanóico
10:36	ácido nonanóico
12:15	Hexatriacontano
13:02	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:32	3,4,3,5-tricloroanilina
13:35	1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno
13:53	2,3,4-tricloroanilina
14:54	Tetratetracontano
15:42	bis(2-metilpropil)ester ácido hexanodióico
16:05	Tetratetracontano
16:11	2,6,10,15-tetrametil heptadecano
17:14	Pentatriacontano
17:21	Pentatriacontano
18:20	Pentatriacontano
19:01	ácido dicosanóico
19:25	Pentatriacontano
20:28	Pentatriacontano

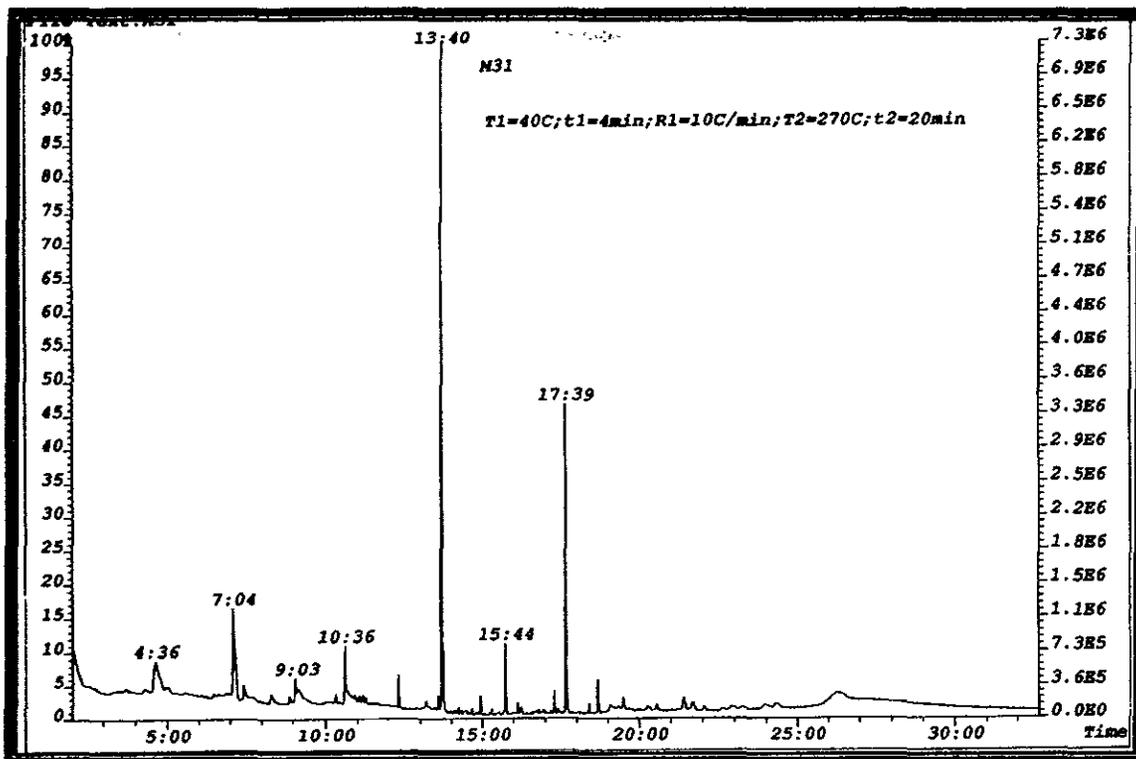


Fig. No. XIV-99.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 11° día.

Tabla No. XIV-54.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 11° día.

Metabolitos generados en el Reactro Anaerobio al 11° día	
T. Retención	Compuesto
4:29	2,2,4,6,6-penta metil-hepta
5:05	ácido hexanóico
6:58	3,5,5-trimetil-2-cicloexeno-1-ona
7:19	1,1,3,3-tetraoxi-propano
8:09	1,2,4-triclorobenceno
8:45	1,2,4-triclorobenceno
9:06	ácido octanóico
10:14	1,2,3-propano trilester ácido hexanóico
10:40	ácido nonanóico
12:14	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
13:03	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:37	ester ácido fosfórico tributil
14:09	1-octanol,2-butil
14:24	dietil ftalato
14:53	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
15:41	bis(2-metilpropil)ester ácido hexanodióico
16:04	tetratetracontano
17:13	tetratetracontano
17:25	metil ester ácido tetradecanóico
17:36	bis(2-metilpropil)ester 1,2- ácido bencendicarboxílico
18:36	ester butil octil 1,2-ácido bencendicarboxílico

21:20	2,2',3,4',5',6-hexa CB
21:33	Tritetracontano
21:54	2,2',3,4',5',6-hexa CB
22:39	Tritetracontano
23:41	bis(2-etilhexil)éster ácido hexanodióico
24:02	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
24:43	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
26:20	bis(2-etilhexil) ftalato

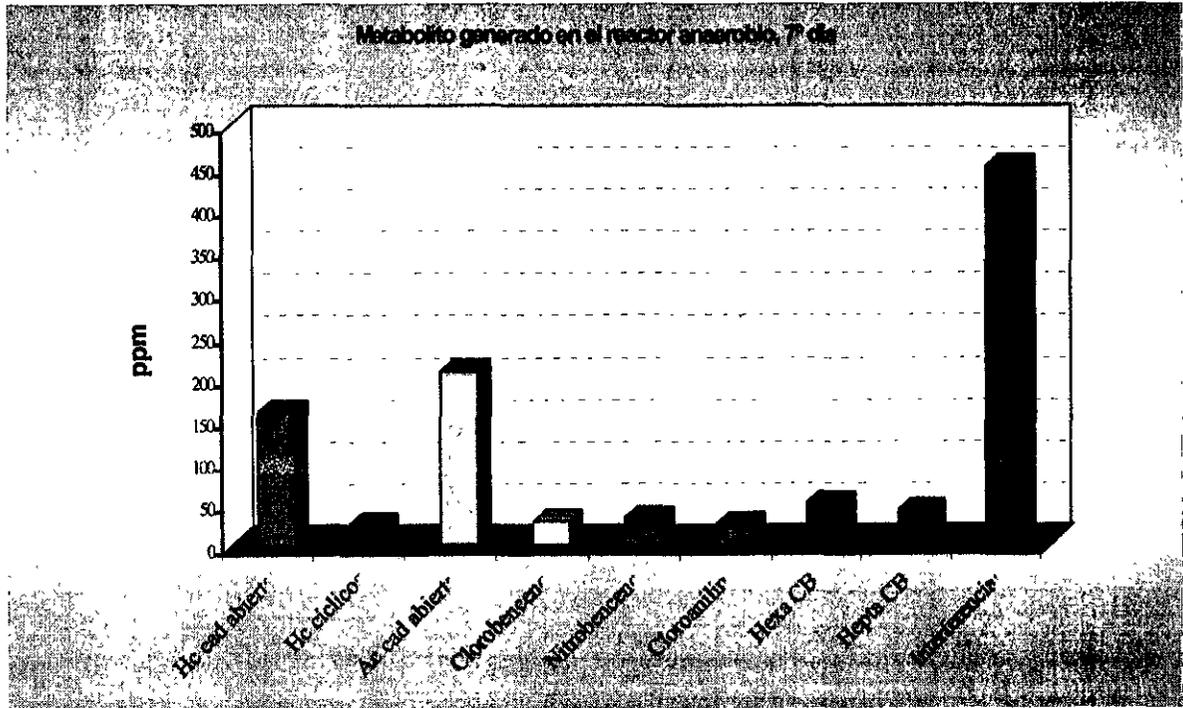


Fig. No.XIV-98.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 7° día.

19:07	ácido hexadecanóico
20:14	9-eicoseno
21:22	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
21:37	tritetracontano
21:56	2,2',3,4,4',5'-hexa CB
22:10	bis(2-metoxifenil)disulfuro
22:31	22',34,4',5'-hexa CB
23:12	11-nitro-1-undeceno
23:52	bis(2-etilexil)éster ácido hexanodíico
24:15	2,3,3',4',5,5',6-hepta CB
26:14	diisocetil ester1,2-ácido bencendicarboxílico

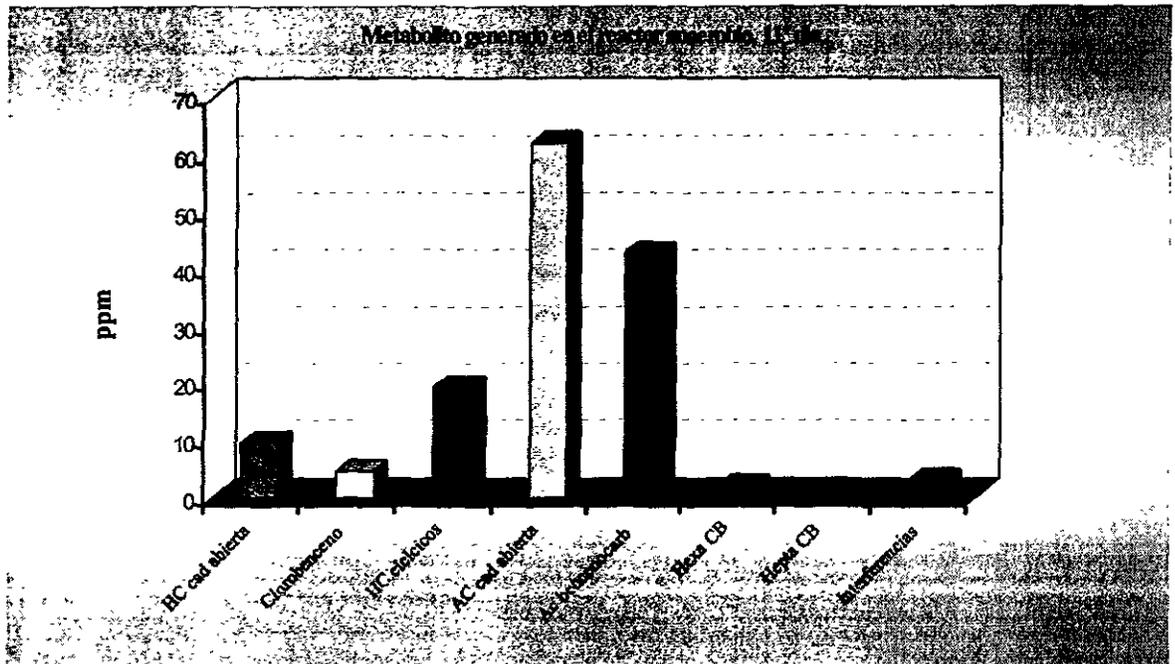


Fig. No.XIV-100 .- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 11° día.

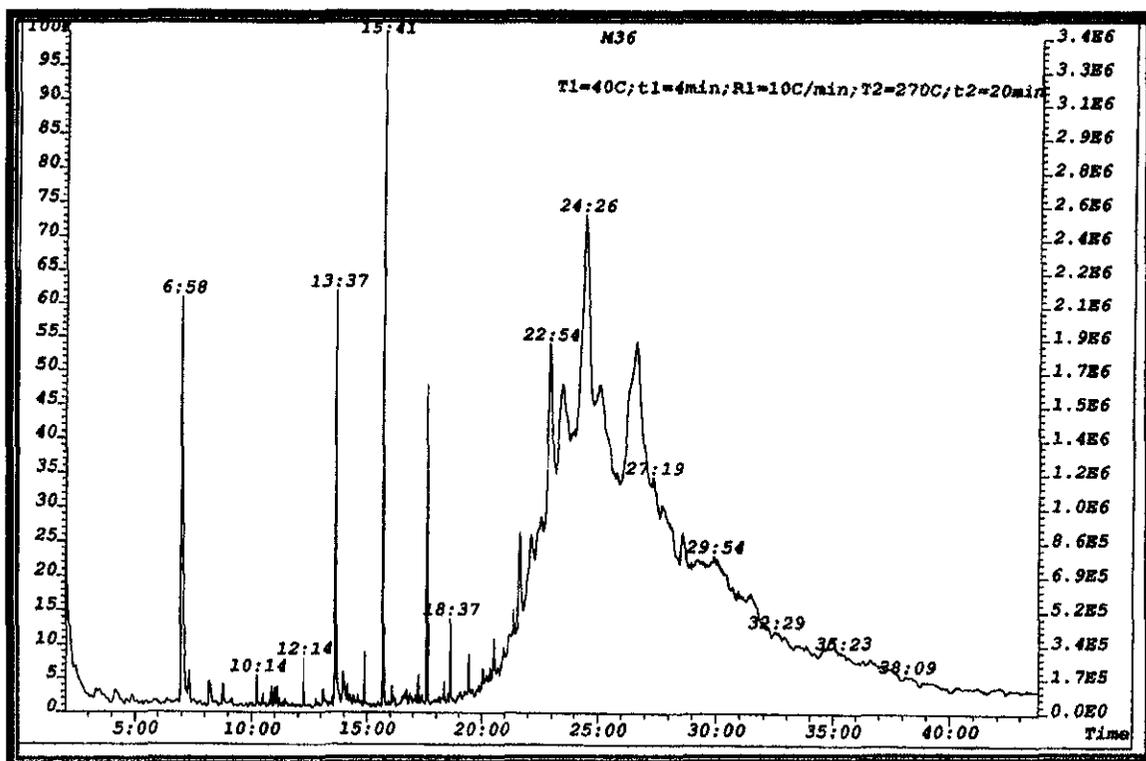


Fig. No. XIV-101.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 15° día.

Tabla No. XIV-55.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 15° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 15° día	
T. Retención	Compuesto
6:58	3,5,5-trimetil-2-ciclohexeno-1-ona
7:19	3,5,5-trimetil-2-ciclohexeno-1-ona
8:10	1,2,4-triclorobenceno
8:46	1,2,4-triclorobenceno
10:14	1,1-dietoxi-3-heptanona
10:30	tetracosano
10:52	1-metil-2-propil-ciclohexano
10:59	2-exil-1-decanol
11:07	tridecanol
12:14	hexatriacontano
13:07	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:37	tributil ester ácido fosfórico
13:57	2,4,6-tricloroanilina
14:53	hexatriacontano
15:41	bis(2-metilpropil)ester ácido hexanodióico
16:05	pentacosano
17:14	1-fluoro-dodecano
17:36	bis(2-metilpropil)ester 1,2- ácido bencendicar
18:37	butiloptilester 1,2-ácido bencendicarboxílico
19:26	tetracontano
21:38	tritetracontano

22:54	tritetracontano
24:26	ácido nonaexacontanóico
24:37	dotriacontano

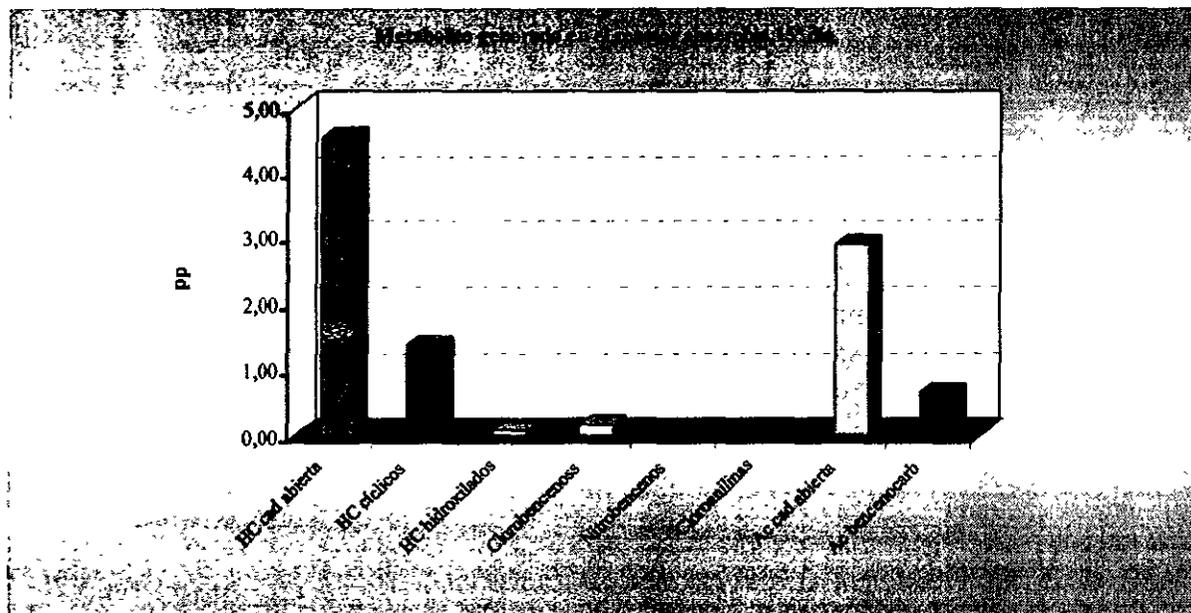


Fig. No. XIV-102.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 15° día.

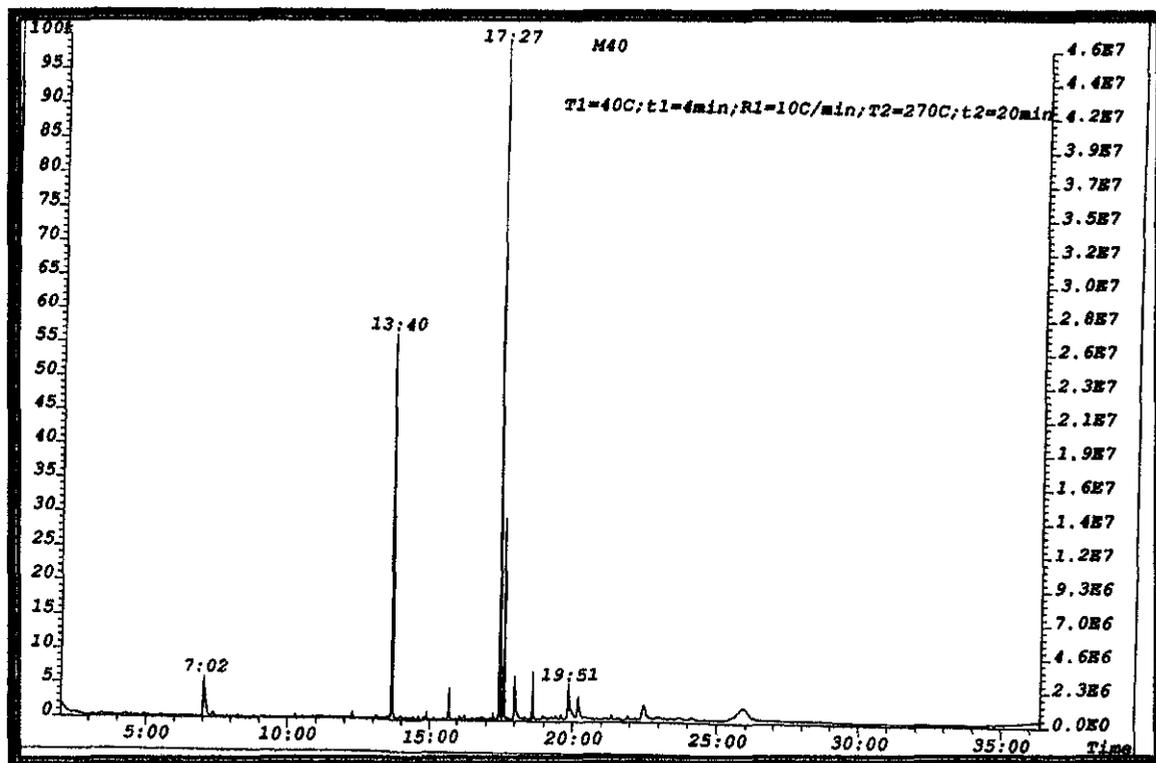


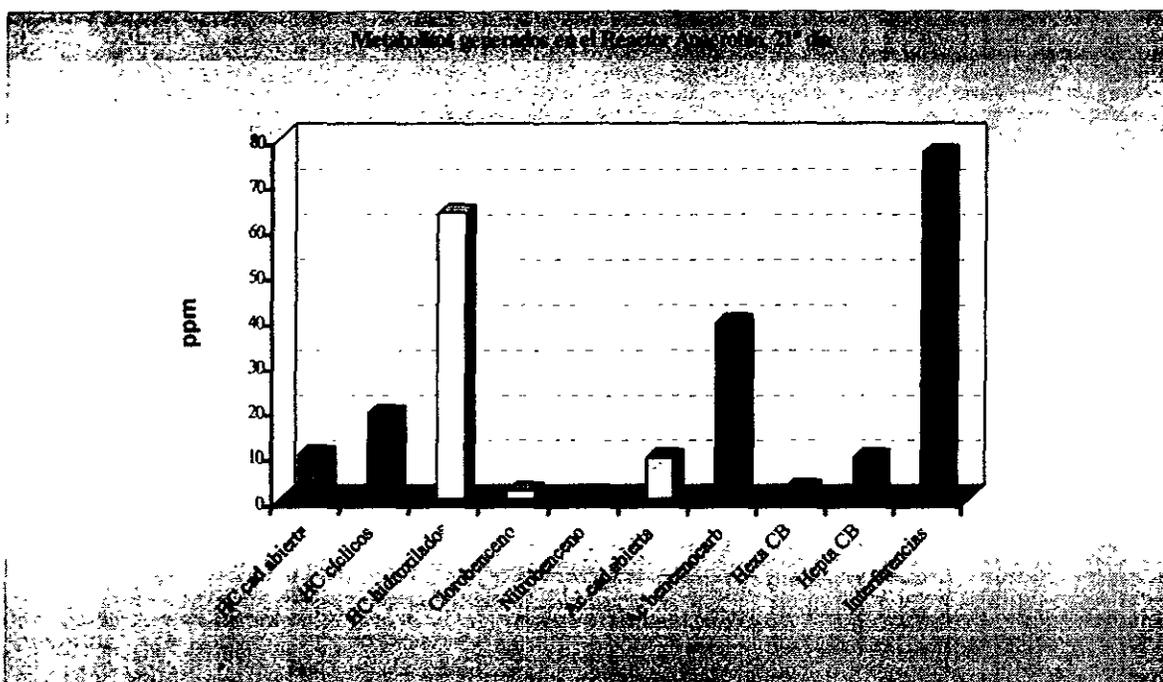
Fig. No. XIV-103.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 21° día.

Tabla No. XIV-56.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 21° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 21° día	
T. Retención	Compuesto
4:16	1,2,3-trimetil benceno
4:57	dodecano
7:02	3,5,5-trimetil-2-ciclohexano-1-ona
7:21	3-(4-clorofenil)-3-buteniloxi trimetil-silano
8:14	1,2,3-triclorobenceno
8:49	1,2,3-triclorobenceno
10:16	2,5-dihidro-2,5-dimetoxi-furano
10:54	6-metil-1-heptanol
11:02	1-butil-2-propil-ciclopentano
11:08	2-metil-3-metileno-nonano
11:14	2,6,11,15-tetrametil-hexadecano
12:17	hexatriacontano
13:05	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:31	hidroxi tolueno butilato
13:40	ester tributil ácido fosfórico
14:54	hexatriacontano
15:42	bis(2-metilpropil)ester ác. hexanodióico

16:05	1-(eteriloxi)-decano
16:15	ester metil ácido tetradecanóico
17:14	dotriacontano
17:27	miristato isopropil
17:36	bis(2-metilpropil)ester-1,2-ác.bencendicar
17:59	1-hexadecanol
18:37	1-hexadecanol
19:51	9-octadeceno-1-ol
20:12	1-heptadecanol
21:21	3,3',4,4',5,5'-hexa CB
21:56	2,2',3,4,4',5'-hexa CB
22:27	1-dotriacontanol
22:55	2,2',3,3',5,5',6-hepta CB
23:43	bis(2-etilxil)ester ácido hexanodióico
24:11	2,3,3',4',5,5',6-hepta CB
25:55	flatalodi-n-octil

Fig. No.XIV-104.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 21° día.



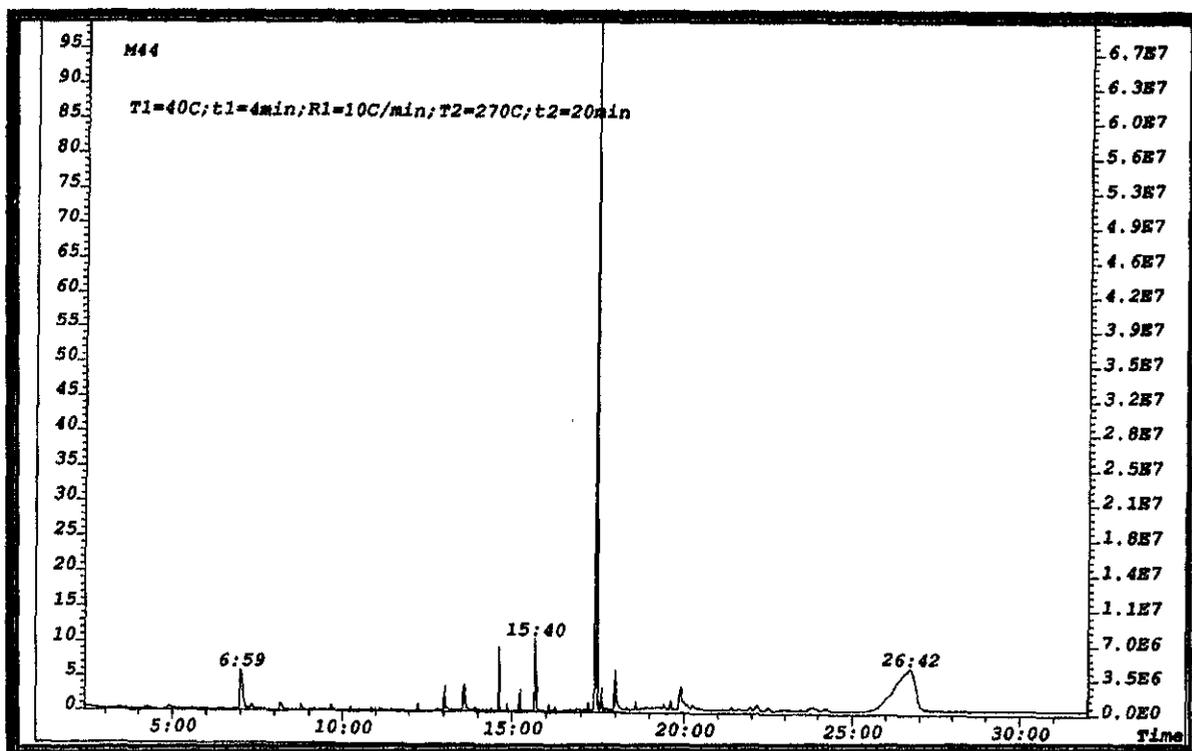


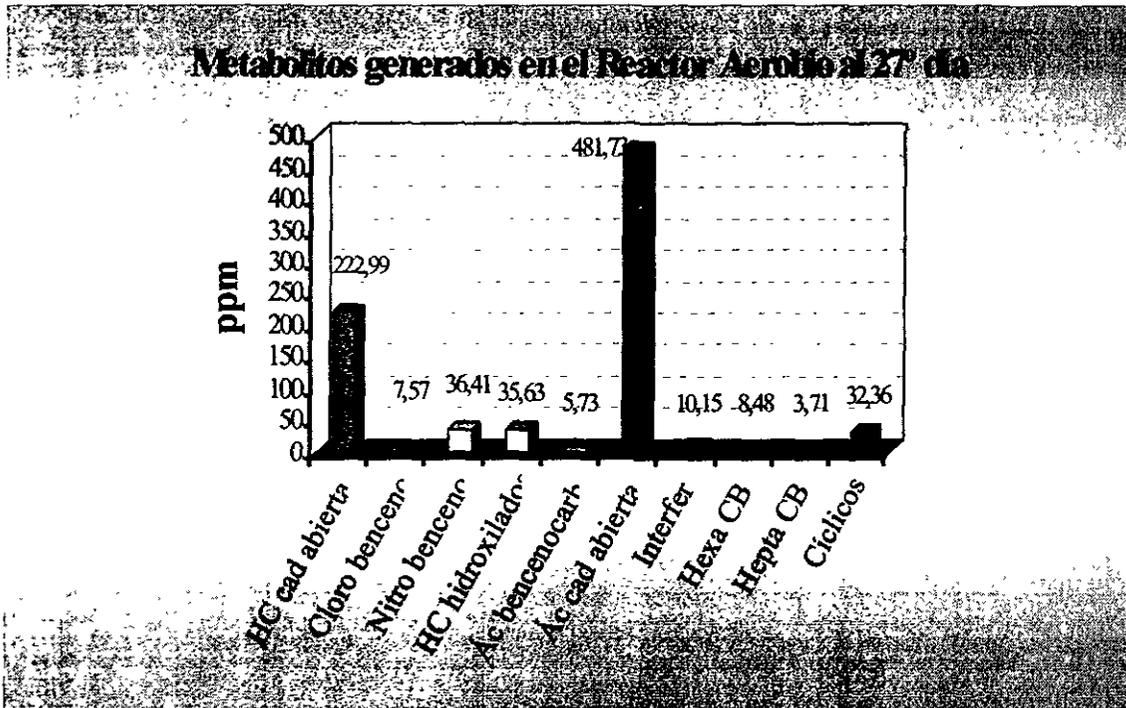
Fig. No. XIV-105.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 27° día.

Tabla No. XIV-57.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 27° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 27° día	
T. Retención	Compuesto
4:54	Dodecano
6:59	3,5,5-trimetil-2-ciclohexanona
7:20	3-(4-clorofenil)-3-buteniloxitrimetil-silano
8:10	1,2,4-triclorobenceno
8:46	1,2,3-triclorobenceno
9:40	tetradecafluoro-hexano
10:15	1,4-diacetil-2-5-dibutilhexahidro-1,2,4,5-tetracina
10:53	Tridecanol
11:00	Tridecanol
11:08	1-pentil-2-propil-ciclopentano
11:12	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
12:15	Pentadecano
13:02	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:35	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno
13:38	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno
14:37	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno
14:52	2,6,10,15-tetrametil-heptadecano
15:15	10-nonadecanamina
15:40	bis(2-metilpropil)ester ácido hexanodióico

16:05	Hexatriacontano
16:15	metil-ester ácido tetradecanóico
17:14	Hexatriacontano
17:27	miristato isopropil
17:36	bis(2-metilpropil)ester-1,2-ácido bencendicarboxílico
17:59	Hexadecanol
18:37	flalato bis(2-metoxi etil)
19:37	ácido hexadecanóico
19:54	alcohol oleico
20:16	1-octadeceno
21:23	2,2',3,3',4,4'-hexa CB
21:57	2,2',3,3',4,4'-hexa CB
22:09	bis(2-metoxifenil)disulfido
22:30	22',44',55'-hexa CB
23:49	bis(2-etilhexil)ester ácido hexanodióico
24:16	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
26:42	diisocetilester ácido ftálico

Fig. No.XIV-106.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 27° día.



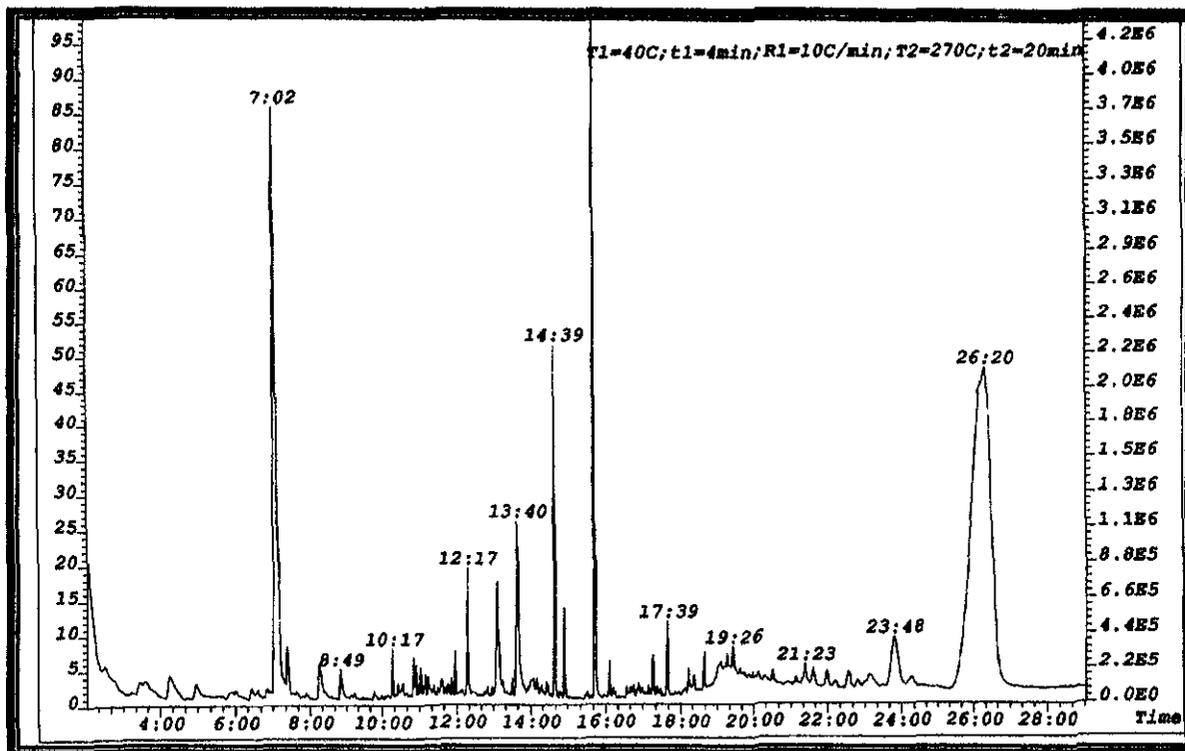


Fig. No. XIV-107.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 34° día.

Tabla No. XIV-58.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 34° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 34° día	
T. Retención	Compuesto
7:02	3,5,5-trimetil-2-ciclohexanona
7:22	3-(4-clorofenil)-3-butenil oxi-trimetil silano
8:15	1,3,5-triclorobenceno
8:49	1,2,4-triclorobenceno
10:17	2,5-dihidro-2,5-dimetoxi furano
10:50	Hexatriacontano
11:58	2,6,10-trimetil dodecano
12:17	Hexatriacontano
13:06	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
13:40	1,3,5-tricloro-2-metoxibenceno
14:39	1,3,5-tricloro-2-metoxibenceno
14:54	Hexatriacontano
15:42	bis(2-metilpropil)ester ácido hexanodióico
16:07	Tetracosano
17:16	3,8-dimetil-decano
17:39	bis(2-metilpropil)ester-1,2-ácido bencendicarboxílico
18:39	ftalato bis(2-metoxi etil)
19:26	3-etil-decano
21:23	2,2',3,4',5',6'-hexa CB

21:37	n-eneicosano
21:59	2,2',3,3',4,6'-hexa CB
22:32	bencilbutil ftalato
23:07	9-octadecen amida
23:48	bis(2-etilhexil)éster ácido hexanodióico
24:18	2,2',3,4,4',5,6-hepta CB
26:20	bis(2-etilhexil) ftalato

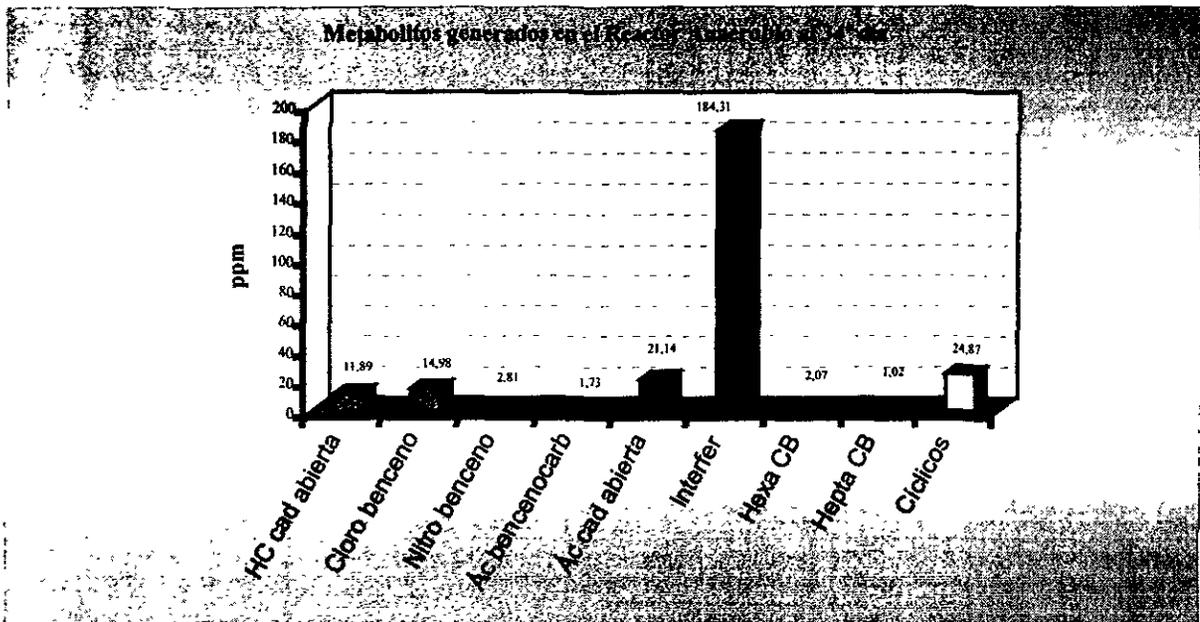


Fig. No.XIV-108.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 34° día.

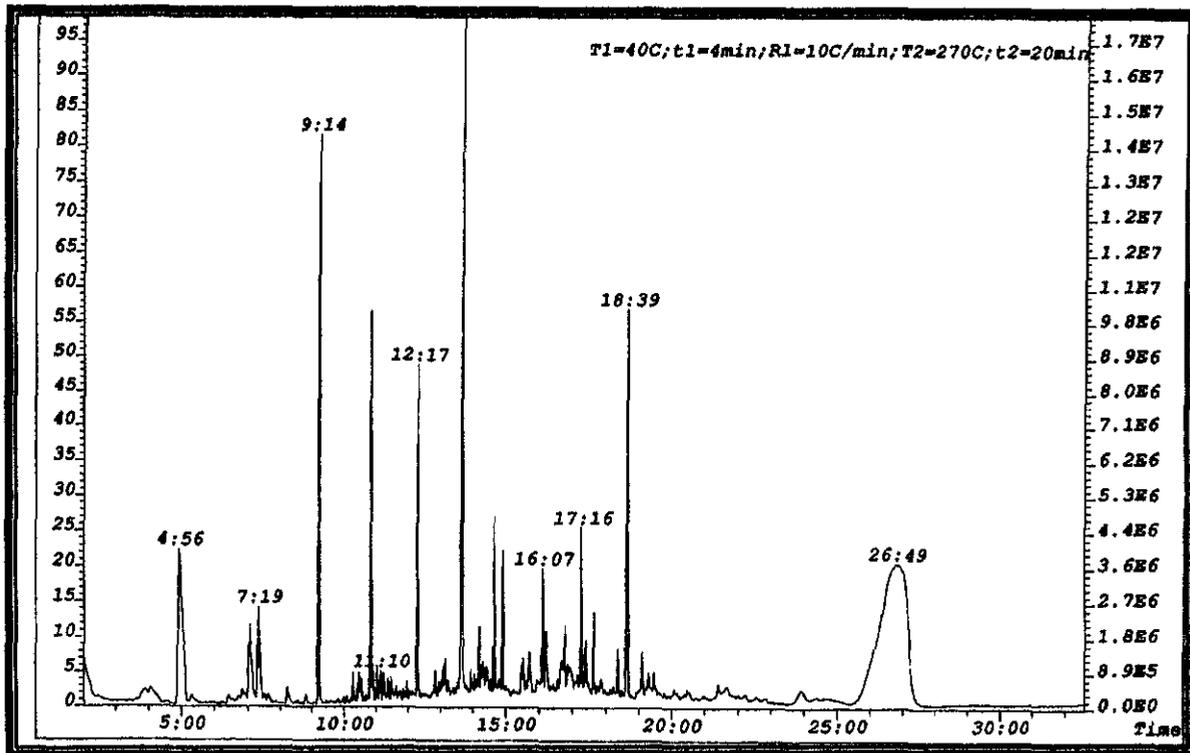


Fig. No. XIV-109.- Cromatograma de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 37° día.

Tabla No. XIV-59.- Tiempos de retención de los metabolitos generados en el reactor anaerobio al 37° día.

Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 37° día	
T.Retención	Compuesto
4:56	decano
7:02	3,5,5-trimetil-2-ciclohexanona
7:19	3,5,5-trimetil-2-ciclohexanona
9:14	dodecano
10:17	2,4,4-trimetilbut-2-enolide
10:50	hexadecano
11:02	tridecanol
11:10	1,1,3,4-tetrametil-trans-ciclopentano
11:14	tetracosano
12:17	hexadecano
12:51	1-(2,2-dimetil propil)-2,4,5-trimetil benceno
13:40	tris(2-etil hexil)ester ácido fosfórico
14:39	tris(2-etil hexil)ester ácido fosfórico
14:56	hexadecano
16:07	hexadecano
17:16	tetratetracontano
17:39	bis(2-metilpropil)1,2-ácido bencendicarboxílico
18:22	tetratetracontano
18:39	dibutil italato
19:07	3,6-nonadecadiona

21:25	dotriacontano
23:55	bis(2-etil hexil)ester ácido hexanodióico
26:49	bis(2-etil hexil) ftalato

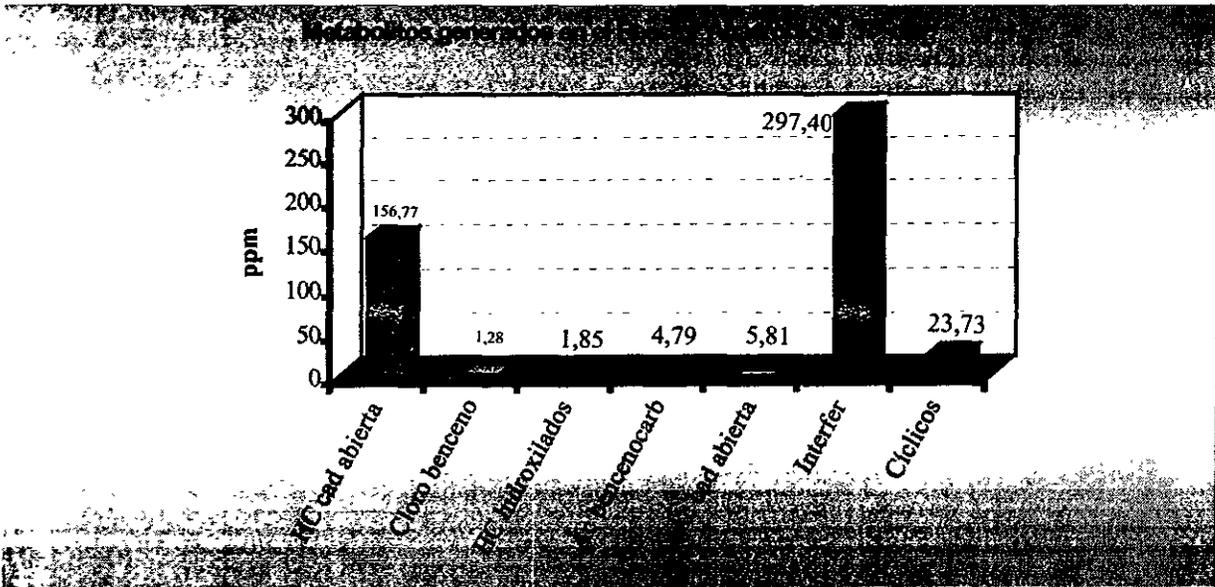


Fig. No.XIV-110.- Metabolitos generados en el Reactor Anaerobio al 37° día.

Cuantificación de metabolitos organoclorados en el Reactor Anaerobio

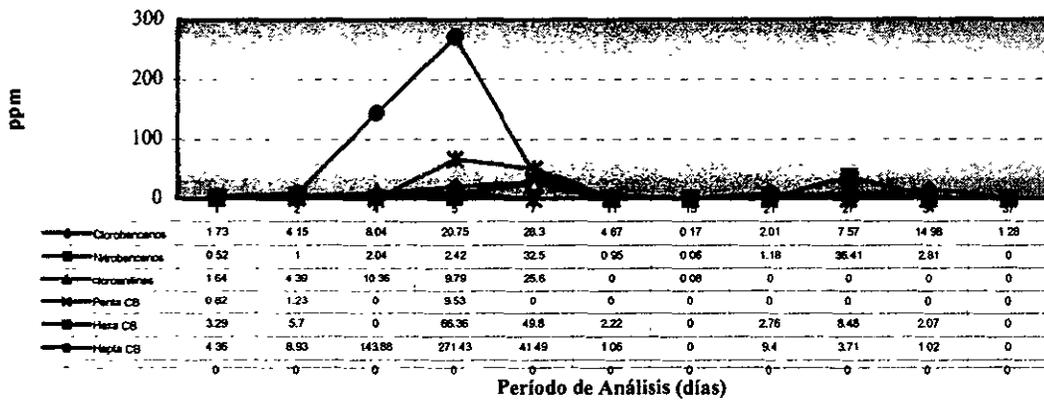


Fig. No. XIV-111.- Cuantificación de los metabolitos generados en el Reactor Anaerobio durante el periodo de tratamiento.

14.20. RENDIMIENTO DE LA BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA

La biodegradación de la mayoría de los congéneres de BPC en el reactor anaerobio, ha alcanzado un buen rendimiento considerando un período 34 días de tratamiento introduciendo 20 ml de BPC aminado a una concentración inicial de 13011.92 ppm pentaclorobifenilos, 137805.71 ppm de hexaclorobifenilos y 329494.91 ppm de heptaclorobifenilos y obteniendo 10 ml de PCB aun sin ser biodegradado (en interior de las membranas) y una concentración de 2.07 ppm de hexaclorobifenilos y 1.02 ppm de heptaclorobifenilos en el medio mineral (1.7 L) en el recipiente del reactor. Los tetra y pentaclorobifenilos han sido biodegradados en su totalidad.

De esta manera, el rendimiento neto del proceso de biodegradación anaerobia de los BPCs que no habían sido aminados es del 63 % para los pentaclorobifenilos, 49.87 % para los hexaclorobifenilos y 49.97 % para los heptaclorobifenilos. Para los octaclorobifenilos no ha sido posible realizar el rendimiento ya que inicialmente no ha sido posible su cuantificación inicial.

Ahora bien, considerando como promedio un 54.28 % del rendimiento anterior y estimando que un 90% de los BPCs aminados son biodegradados en el mismo proceso, el rendimiento neto de biodegradación en el reactor anaerobio es 79.87 %.

Metabolitos Organoclorados Generados en el Reactor Anaerobio			
1° día	2° día	6° día	5° día
1,2,4-triclorobenceno	1,2,4-triclorobenceno	1,3,5-triclorobenceno	1,2,5-triclorobenceno
1,2,4-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno	1,2,3-triclorobenceno
2,3,4-tricloroanilina	2,3,4-tricloroanilina	2,4,6-tricloroanilina	2,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
2,4,6-tricloroanilina	2,4,6-tricloroanilina	2,3,4-tricloroanilina	2,3,4-tricloroanilina
22', 44', 6-penta CB	23, 3'4', 6-penta CB	22', 34,4'5,6-hepta CB	2,4,6-tricloroanilina
22', 44', 5-penta CB	22', 33', 44'-hexa CB		22', 44', 6-penta CB
22', 33', 44'-hexa CB	22', 34, 4'5'-hexa CB		23, 4'5, 6-penta CB
22', 44', 55'-hexa CB			22', 34, 4'5'-hexa CB
23, 3'4, 4'5, 5'-hepta CB			22', 33', 44'-hexa CB
22', 33', 55', 6-hepta CB			22', 34, 55'-hexa CB
23, 3'4', 55', 6-hepta CB			22', 44', 55'-hexa CB
			22', 33', 55', 6-hepta CB
			33', 44', 55', 6-hepta CB
			22', 33', 44', 56'-octa CB
7° día	11° día	15° día	21° día
1,2,3-triclorobenceno	1,2,4-triclorobenceno	1,2,4-triclorobenceno	1,2,3-triclorobenceno
1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno
2,3,4-tricloroanilina	33', 44', 55'-hexa CB	2,4,6-tricloroanilina	33', 44', 55'-hexa CB
1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno	22', 34, 4'5'-hexa CB		22', 34, 4'5'-hexa CB
22', 34', 5'6-hexa CB	22', 34, 4'5'-hexa CB		22', 33', 55', 6-hepta CB
22', 34, 4'5, 6-hepta CB	23, 3'4', 55', 6-hepta CB		23, 3'4', 55', 6-hepta CB
27° día	34° día	37° día	
1,2,4-triclorobenceno	1,3,5-triclorobenceno	1,3,5-triclorobenceno	
1,2,3-triclorobenceno	1,2,4-triclorobenceno	--	
1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno	--	
1,3,5-tricloro-2-nitrobenceno	1,3,5-tricloro-2-metoxibenceno	--	
22', 33', 44'-hexa CB	22', 34, 5'6-hexa CB	--	
22', 44', 55'-hexa CB	22', 33', 46'-hexa CB	--	
22', 34, 4'5, 6-hepta CB	22', 34, 4'5, 6-hepta CB	--	

Tabla XIV-60.- Metabolitos organoclorados generados en el reactor anaerobio durante todo el período de tratamiento

Como se observa, la tabla XIV-61 muestra los resultados obtenidos de la comparación de las tablas XIV-60 (congéneres de BPCs que permanecen entre los metabolitos organoclorados en el reactor anaerobio) y tabla XIV-34 (congéneres de BPCs que fueron introducidos al reactor). En la tabla se observa que el isómero 100 de los pentaclorobifenilos es detectado en el medio al 1º y 5º día y es degradado completamente en los días sucesivos del tratamiento. Sin embargo, durante estos primeros 5 días de tratamiento aparecen en el medio los isómeros: 99 al 1º día, 98 al 2º día y el 103 al 5º día, probablemente como productos de dechloración, pero de igual manera que los demás, tienden a ser degradados durante el período posterior de tratamiento.

De los hexaclorobifenilos, los isómeros 129, 153, 149 y 137 permanecen en el medio durante varios días del período de tratamiento y aparecen además los isómeros 141, 169, y 131 como productos de dechloración.

Los isómeros 181 y 185 de los heptaclorobifenilos permanecen en el medio durante varios días del tratamiento; sin embargo los isómeros 178, 185 y 189 que se detectaron en el medio al 1º y 5º día como productos de dechloración, tienden a degradarse durante el transcurso del tratamiento.

De los isómeros octaclorobifenilos sólo el 195 aparece en el medio al 5º día de tratamiento pero es dechlorado durante todo el período posterior de tratamiento.

En los análisis de metabolitos al 37º día no existe ninguno de los compuestos cloronitrobenzenos, cloroanilinas ni BPCs debido probablemente a algún error en la técnica de extracción de los metabolitos; solo se observa un compuesto de tipo 1,3,5 triclorobenceno.

Congéneres de BPCs que permanecen en el medio							
Pentaclorobifenilo	No. IUPAC	Hexaclorobifenilo	No. IUPAC	Heptaclorobifenilo	No. IUPAC	Octaclorobifenilo	No. IUPAC
22',44',6-CB	100	22',33',44'-CB	129	22',3'4',55',6-CB	185	22',33',44',56-CB	195
		22',44',55'-CB	153	22',34,45',6-CB	181		
		22',34',5'6-CB	149				
		22',34,4'5-CB	137				
Congéneres de BPCs formados como productos de dechloración							
Pentaclorobifenilo	No. IUPAC	Hexaclorobifenilo	No. IUPAC	Heptaclorobifenilo	No. IUPAC	Octaclorobifenilo	No. IUPAC
22',44',5-CB	99	22',34,55'-CB	141	23,3'4,4'5,5'-CB	189	--	
22',3'4',6-CB	98	33',44',55'-CB	169	22',33',55',6-CB	178	--	
22,4'5,6-CB	103	22',33',46-CB	131	22',34',55',6-CB	185	--	

Tabla No. XIV-61.- Congéneres de BPCs que permanecen en el medio y productos de dechloración generados en el reactor anaerobio.

Resulta difícil realizar la comparación de los resultados del presente estudio, con las investigaciones presentadas por diversos autores sobre la dechloración de BPCs; debido principalmente a que tales estudios, se han realizado utilizando cepas puras de microorganismos y con isómeros aislados de BPCs; en tanto que en el presente estudio, se utilizó una mezcla de diferentes microorganismos y una mezcla de isómeros la mayoría de los cuales, posee grupos amino introducidos lo que infiere otro mecanismo enzimático diferente de la dechloración biológica. Además de que en el proceso de biodegradación utilizado, las condiciones y el tipo de reactor son diferentes, por lo tanto no hay punto de comparación.

Sin embargo, los resultados del presente análisis del tratamiento anaerobio, concuerdan con los estudios realizados por Quensen (1990) sobre la dechloración de los congéneres más altamente clorados (octa y heptaclorobifenilos) sin embargo, parece existir también la dechloración de congéneres menos clorados debido probablemente a la sustitución de los grupos amino por grupos hidroxilos con eliminación fortuita de átomos de cloro vecinos; estudio que deberá ser confirmado por análisis cromatográficos utilizando isómeros puros.

Las rutas de dechloración propuestas por Tiedje (1993) son aplicables a los resultados obtenidos en la presente investigación al menos en lo referente a la dechloración preferencial de los congéneres en las posiciones *meta*>*para*>*orto* sin embargo, no ha sido posible seguir las rutas completas de cada uno de los congéneres debido a la dificultad de trabajar con una mezcla compleja de isómeros. Es importante hacer notar que en el presente estudio, la dechloración se debe también a la sustitución química de los grupos amino por grupos OH y no sólo a la actividad enzimática de los microorganismos.

Los resultados de la presente investigación confirman los estudios de Tiedje (1993) sobre la eficiencia de dechloración de los diferentes congéneres en rangos de temperatura entre 20° y 25° C.

14.21. OTROS PARÁMETROS DETERMINADOS EN LOS REACTORES

La determinación de parámetros fisicoquímicos se realizó durante todo el tiempo que duró el proceso de tratamiento biológico. El período de experimentación en el reactor aerobio comprendió del 1 de Julio al 21 de Agosto y del 1 de Julio al 10 de Agosto de 1998 en el reactor anaerobio, con muestreos diarios durante los primeros 24 días y posteriormente cada segundo y tercer día.

14.21.1. Determinación de Ecotoxicidad

Los valores de ecotoxicidad, de los metabolitos generados al primer y tercer día en ambos reactores superan el límite inferior permitido, por lo que se considera que en los reactores no existen problemas de toxicidad por acumulación de metabolitos como se muestra en la tabla XIV-62.

Tabla No.XIV-62.- Valores obtenidos de los análisis de ecotoxicidad de los metabolitos en los reactores

Muestra	EC ₅₀ (% v/v)	EC ₅₀ (mg/l)	EC ₅₀ límite (mg/l)/3.000*
Reactor Aerobio 1° día	H ⁽²⁾	>1.10 ⁶	>333.33
Reactor Aerobio 3° día	H ⁽²⁾	>1.10 ⁶	>333.33
Reactor Anaerobio 1° día	H ⁽²⁾	>1.10 ⁶	>333.33
Reactor Anaerobio 3° día	H ⁽²⁾	>1.10 ⁶	>333.33

*Cociente EC₅₀/ límite: número de veces que la EC₅₀ de la muestra supera el valor 3.000 mg/l considerado como límite para definir el carácter ecotóxico de una sustancia. (BOE/270/1989).

⁽²⁾ H = mayor que el estándar más alto.

Durante el proceso de biodegradación de los BPCs aminados, uno de los principales productos que se intentó determinar fue la formación de CO₂ sin embargo, no fue posible hacerlo debido a fugas del gas por la falta de condiciones herméticas en el reactor.

14.21.2. pH

Los resultados obtenidos de la determinación del pH en los reactores aerobio y anaerobio se encuentran en las tablas XIV-63 y XIV-64 y representados en la figura XIV-112.

Durante todo el período de tratamiento en ambos reactores, los valores de pH se mantuvieron cercanos a la neutralidad, aunque existieron ligeras variaciones con rangos de 7.0 a 7.4 sin afectar los procesos de biodegradación. Esto es debido a la eficiencia del buffer de fosfatos añadido para mantener condiciones de pH adecuadas en el medio.

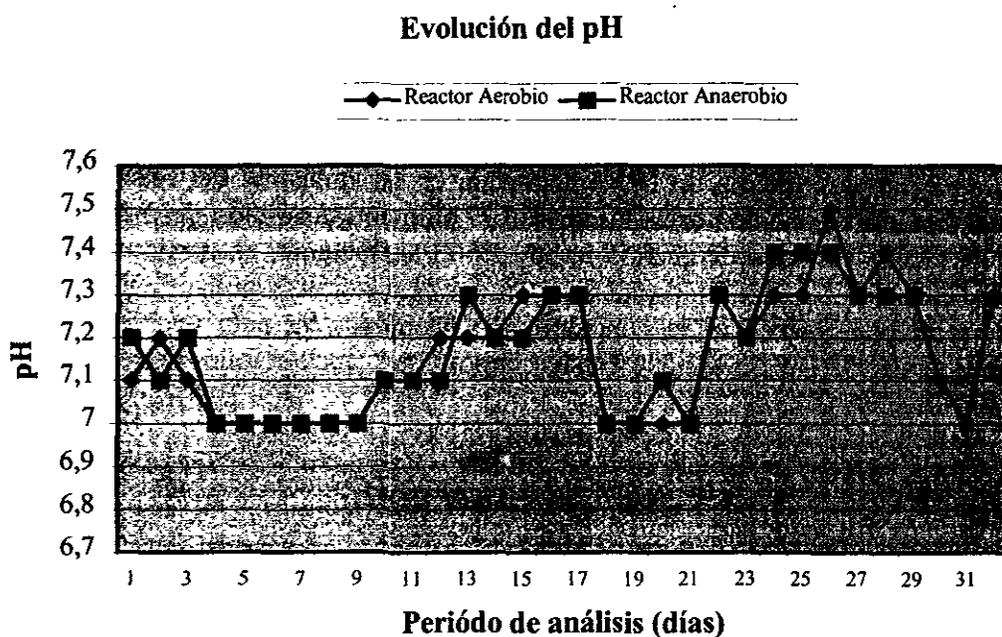


Fig. No.XIV- 112.- Determinación de pH en los reactores Aerobio y Anaerobio.

14.21.3. Temperatura

Los resultados obtenidos en la determinación de temperatura de los reactores aerobio y anaerobio se muestran en la tabla XIV-63 y XIV-64.

En el reactor aerobio la temperatura siempre se mantuvo en 24°C por medio de una estufa con la temperatura controlada.

En el reactor anaerobio (que operó sin control de temperatura) existieron variaciones en la temperatura que oscilan entre 20 y 24 °C; sin embargo, esta variación no afectó en gran medida el proceso de biodegradación de los BPCs aminados.

14.21.4. Oxígeno disuelto

Los resultados obtenidos de la determinación de oxígeno disuelto en el reactor aerobio, se muestran en la tabla XIV-63 ; como se puede apreciar, los valores corresponden a la saturación de oxígeno, por lo cual la disponibilidad de oxígeno en el medio, no es un factor limitante durante el proceso de biodegradación.

14.21.5. Demanda Química de Oxígeno

Los resultados de los análisis de DQO aparecen relacionados en las tablas XIV-63 y XIV-64 y representados en las figuras XIV-113 y XIV-114.

La concentración media de DQO analizada en las muestras del reactor aerobio ha sido 179.05 mg/l con una desviación estándar de 106.77 sólo con la adición del BPC aminado; pero si se tienen en cuenta los valores cuando se añadió el surfactante, (a partir del día 26) éstos se incrementan hasta 561.16 mg/l en promedio, con una desviación estándar de 896.78.

En el reactor anaerobio la concentración promedio ha sido de 129.24 mg/l con una desviación estándar de 136.55 aunque existen importantes fluctuaciones durante el transcurso del tratamiento.

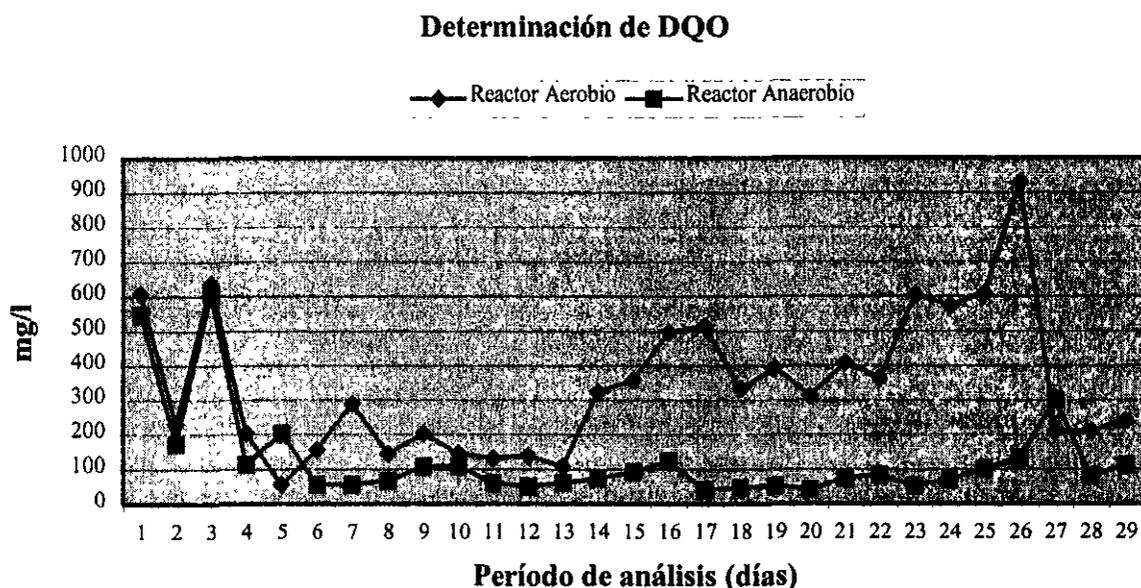


Figura No.XIV-113 .- Determinación de DQO en los reactores

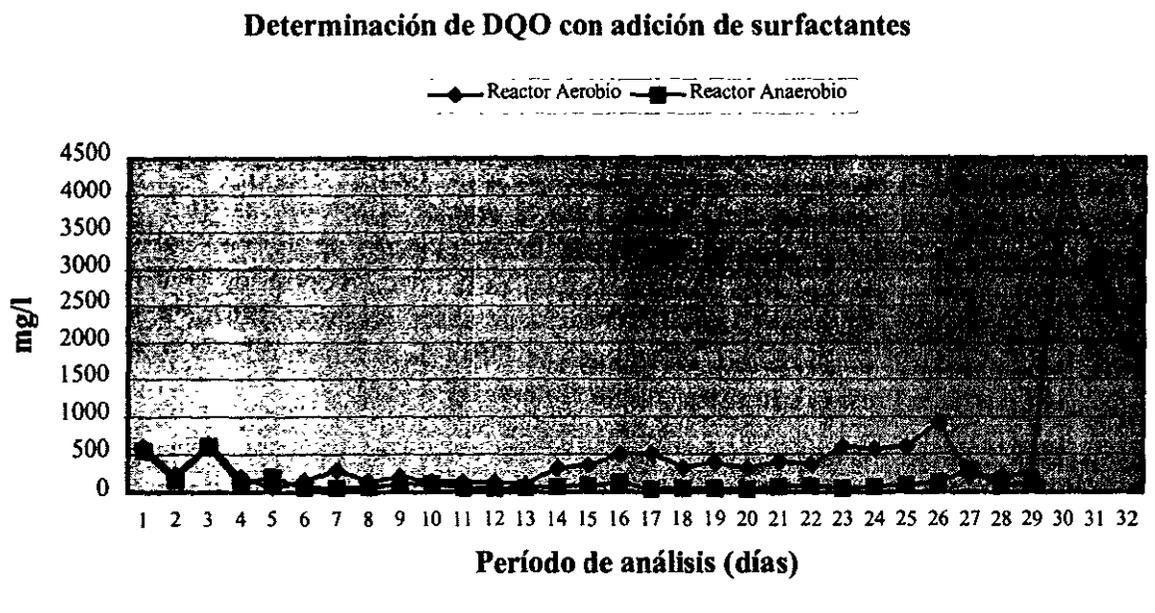


Fig. No. XIV- 114.- Incremento de DQO por adición de surfactantes en el reactor aerobio

14.21.6. Demanda Bioquímica de Oxígeno

Los resultados de DBO determinados en el reactor aerobio se presentan en la tabla XIV-63. La concentración media es de 121.73 mg/l con una desviación estándar de 55.12 aunque existen importantes fluctuaciones durante el período de biodegradación figura XIV-115.

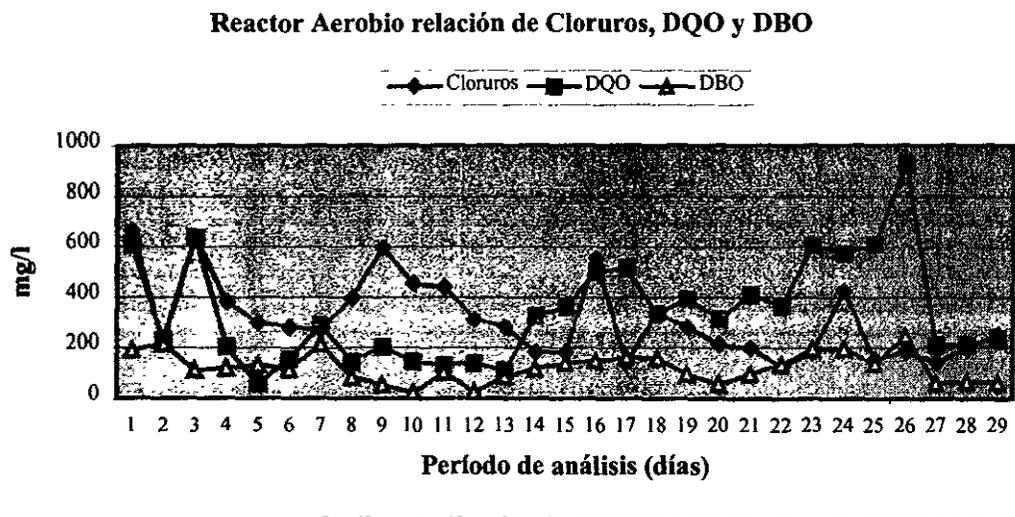


Fig. No. XIV-115.- Relación DBO, DQO y Cloruros generados en el reactor aerobio

14.21.7. Cloruros

Los resultados obtenidos de la determinación de cloruros realizada en ambos reactores se presenta en las tablas XIV-63 y XIV-64 y se encuentran representadas en las figuras XIV-116 y XIV-117.

La concentración media de cloruros analizada en el reactor aerobio, ha sido de 299.34 mg/l con una desviación estándar de 151.36. Para el reactor anaerobio es de 305.73 con una desviación de 155.70; como se aprecia, la generación de cloruros en ambos reactores sigue un comportamiento similar. Sin embargo, cuando se analiza la relación entre los cloruros generados del proceso de tratamiento aerobio y la de DBO se puede observar que conforme se incrementa la concentración de cloruros en el medio, los valores de DBO disminuyen debido probablemente a un efecto negativo de la presión osmótica celular (Figura XIV-115).

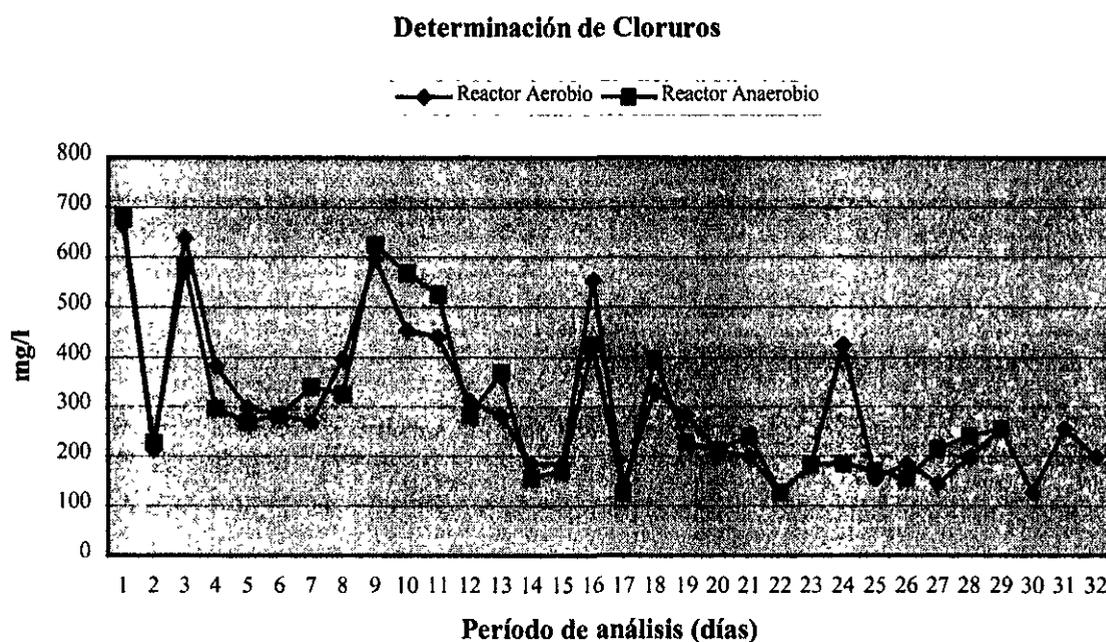


Fig. No. XIV- 116.- Determinación de Cloruros generados en los reactores

Reactor Anaerobio relación Cloruros y DQO

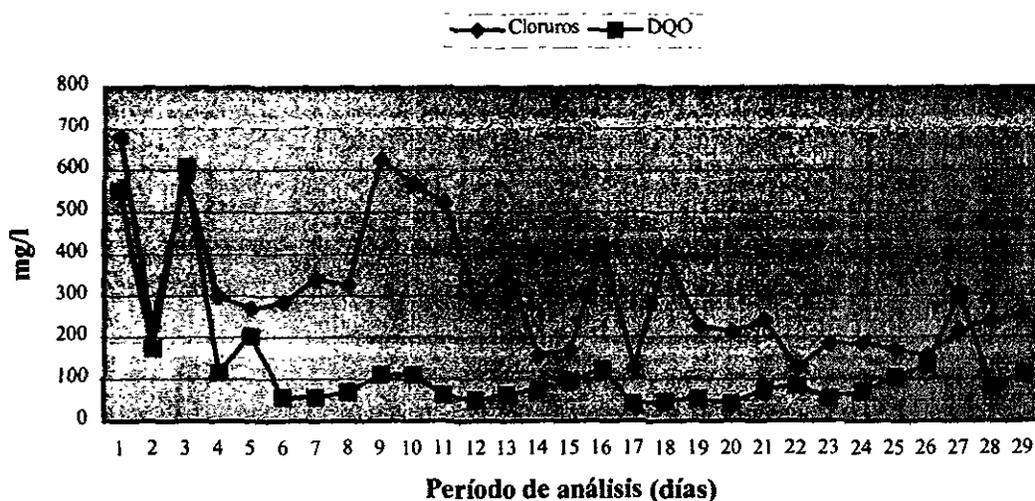


Fig. No. XIV- 117.- Relación de DQO y Cloruros generados en el reactor anaerobio

No es común encontrar trabajos de investigación que proporcionen información sobre las enzimas involucradas en la eliminación de cloros en el tratamiento aerobio; sin embargo, los resultados obtenidos en la presente investigación, proporcionan indicios que apoyan los estudios de Ligen (1980) sobre la eliminación de Cl del anillo cuando existe suficiente oxígeno molecular en medio.

14.21.8. Carbono Orgánico Total

La determinación de Carbono Orgánico Total (COT) e Inorgánico (CIT) en los reactores aparecen relacionados en las tablas XIV-63 y XIV-64 y representadas en las figuras XIV-118 y XIV-119.

La concentración media de CIT y COT analizadas en las muestras del reactor aerobio han sido 46.11 ppm y 50.73 ppm con una desviación estándar de 11.68 y 52.61 respectivamente. Como se observa, los altos valores de la desviación corresponden al período de adición del surfactante.

En el reactor anaerobio, la concentración promedio ha sido de 31.03 ppm y 14.92 ppm con una desviación estándar de 12.33 y 8.43 respectivamente.

El rendimiento de eliminación de COT en el reactor aerobio no teniendo en cuenta los valores de la adición de surfactantes es del 78% y de del 69.8 % para el anaerobio.

La concentración de carbono inorgánico en el reactor anaerobio es menor en comparación con la concentración del aerobio debido a su rápida transformación en CO_2 y CH_4 que refleja una mayor actividad microbiana en el sistema. Probablemente, las diferencias en la transferencia de masas de la biopelícula activa en ambos reactores se deben también al mismo fenómeno.

Relación de Carbono Orgánico e Inorgánico en el Reactor Anaerobio

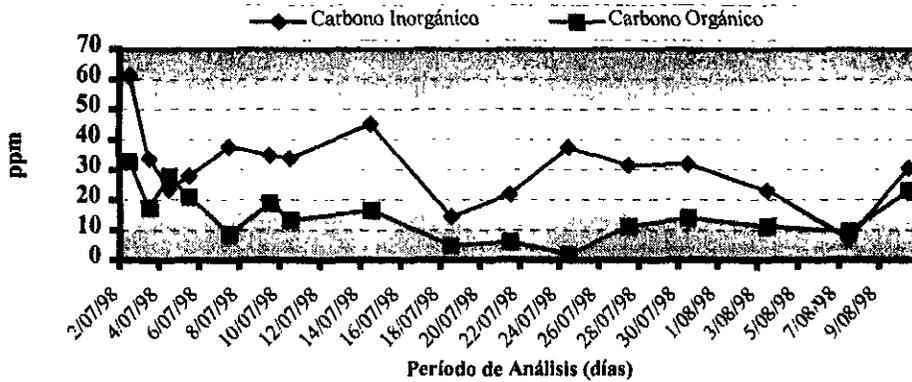


Fig. No. XIV-118.- Relación de Carbono Orgánico e Inorgánico en el Reactor Anaerobio

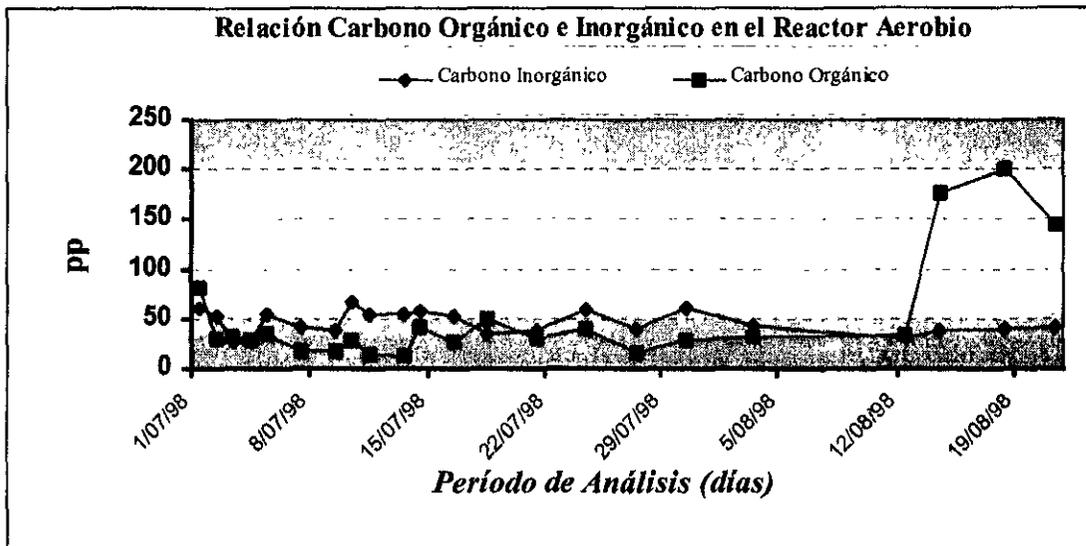


Fig. No. XIV-119.- Relación de Carbono Orgánico e Inorgánico en el Reactor Aerobio

TABLA NO. XIV-63 .- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DEL REACTOR AEROBIO (I) UTILIZANDO BPC AMINADO COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO .

Fecha	pH	Temp. °C	Cloruros mg/l	O ₂ Disuelto mg/l	DQO mg/l	DBO mg/l	Carbono Inorgánico mg/l	Carbono Orgánico mg/l	Inoculación .	Adición de Medio	Observaciones
1 Julio	7.1	24	665.0	7.9	609	191.1	61.0	81.45	No	Si	
2 Julio	7.2	25	212.7	7.8	232	216.3	52.28	30.59	Si	Si	
3 Julio	7.1	25	638.1	7.8	638	112.2	26.73	32.13	No	Si	
4 Julio	7.0	25	382.9	7.8	203	120.3	27.28	28.56	Si	Si	Pegado de fuga de cámara sup.
5 Julio	7.0	25	297.8	7.8	58	132.6	53.68	34.47	No	Si	
6 Julio	7.0	25	283.6	7.8	156	114.0			Si	Si	
7 Julio	7.0	25	269.4	7.8	290	213.0	41.17	17.37	No	Si	
8 Julio	7.0	25	397.0	7.8	145	84.0			Si	No	Metab. Cada 2 días
9 Julio	7.0	25	595.6	7.8	203	57.0	39.18	18.41	No	Si	
10 Julio	7.1	25	453.7	7.8	145	24.0	67.06	29.37	Si	Si	
11 Julio	7.1	25	440.0	7.8	133.4	105.0	54.90	13.68	No	Si	
12 Julio	7.2	24	311.9	7.9	139.2	28.5			No	Si	
13 Julio	7.2	24	283.6	7.9	110.2	85.5	53.84	12.16	Si	Si	
14 Julio	7.2	49	184.3	5.3	342.8	116.4	57.01	41.02	Si	Si	Reactor quemado, siembra de bichos
15 Julio	7.3	24	184.3	7.9	360.	141.0			Si	No	
16 Julio	7.3	24	553.0	7.9	500	147.9	53.24	27.84	Si	No	
17 Julio	7.3	24	141.8	7.9	515.6	163.5			Si	No	
18 Julio	7.0	24	333.2	7.9	333.8	157.2	34.79	49.89	Si	Si	
19 Julio	7.0	24	283.6	7.9	394.5	96.0			Si	No	
20 Julio	7.0	24	212.7	7.9	312.7	59.1			Si	No	
21 Julio	7.0	24	198.52	7.9	409.7	97.2	38.59	29.65	Si	Si	
22 Julio	7.3	24	127.62	7.9	364.2	134.7			Si	No	Adición de 10 ml. De BPC aminado
23 Julio	7.2	24	184.34	7.9	607	195			Si	No	Modific. Camara sup. Tubos nuevos
24 Julio	7.3	24	425.4	7.9	576	196	58.88	39.74	Si	Si	
25 Julio	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
26 Julio	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
27 Julio	7.3	24	156.0	7.9	610	138	40.55	15.29	Si	Si	Determinaciones cada 3 días
28 Julio	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
29 Julio	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
30 Julio	7.5	24	184.3	7.9	330	245	61.10	29.15	Si	Si	
31 Julio	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
3 Agosto	7.3	24	145.5	7.9	210	62.0	42.73	32.04	Si	Si	
7 Agosto	7.4	24	198.5	7.9	210	66.0			Si	Si	
11 Agost	7.3	24	255.2	7.9	240	64.0	29.71	33.14	Si	Si	Aplicación de surfactante
14 Agost	7.1	24	127.0	7.9	4260	98.0	38.31	175.68	Si	Si	
18 Agost	7.0	24	255.6	7.9	3180	115	40.08	199.79	Si	Si	
21 Agost	7.3	24	198.5	7.9	1932	120	30.17	144.59	--	--	

TABLA NO. XIV-64 .- DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DEL REACTOR ANAEROBIO (2) UTILIZANDO BPC AMINADO COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO Y NITRÓGENO

<i>Fecha</i>	<i>pH</i>	<i>Temp. °C</i>	<i>Cloruros mg/l</i>	<i>DQO mg/l</i>	<i>Carbono inorgánico mg/l</i>	<i>Carbono orgánico mg/l</i>	<i>Medio</i>	<i>Observaciones</i>
1 Julio	--	--	680.6	551			Si	
2 Julio	7.1	20	226.8	174	61.35	33.05	Si	
3 Julio	7.2	20	581.4	609	33.73	17.37	Si	
4 Julio	7.0	20	297.8	116	24.57	28.00	Si	Cámara sup. Rota introducción/ memb y lav.
5 Julio	7.0	20	269.5	203	28.05	21.15	Si	
6 Julio	7.0	20	283.6	58			Si	
7 Julio	7.0	20	340.3	58	37.71	8.67	SI	
8 Julio	7.0	22	326.0	69.6			NO	Metabolitos cada 2 días
9 Julio	7.0	22	623.9	110.2	34.87	18.90	Si	
10 Julio	7.1	22	567.2	110.2	33.82	13.50	Si	
11 Julio	7.1	22	524.6	63.8			Si	
12 Julio	7.1	21	283.6	52.2			No	
13 Julio	7.3	21	368.6	63.8			Si	
14 Julio	7.2	21	156.9	75.4	45.03	16.52	Si	
15 Julio	7.2	21	170.16	94.7			No	
16 Julio	7.3	22	425.4	124.3			No	
17 Julio	7.3	21	127.62	42.50			No	
18 Julio	7.0	23	397.04	48.5	14.52	4.88	Si	
19 Julio	7.0	24	226.8	54.6			No	
20 Julio	7.1	23	212.7	42.5			No	
21 Julio	7.0	23	241.06	75.87	21.86	6.21	Si	Adición de 10 ml de BPC aminado
22 Julio	7.3	23	127.62	84.98			No	
23 Julio	7.2	23	184.34	54.63			Si	Cambio Medio .Reactor vacio por fuga
24 Julio	7.4	23	184.34	72.89	37.43	1.86	Si	
25 Julio	--	--	--	--			--	
26 Julio	--	--	--	--			--	
27 Julio	7.4	23	170.16	104.72	31.52	11.35	Si	Determinaciones cada 3 día
28 Julio	--	--	--	--			--	
29 Julio	--	--	--	--			--	
30 Julio	7.4	24	155.9	133.8	31.95	14.11	Si	
31 Julio	--	--	--	--			--	
3 Agosto	7.3	23	216	302.5	23.09	11.26	Si	
7 Agosto	7.3	24	241.0	84	7.30	9.60	Si	
10 Agosto	7.3	24	255.2	114	30.64	23.15	Si	

Capítulo XV.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se establecen de manera general las posibilidades de tratar a los BPCs mediante tratamientos fisicoquímicos y biológicos utilizando reactores de biomembrana en fases aerobia y anaerobia.

Los objetivos propuestos en proyecto de investigación se han conseguido en su totalidad. Los resultados expuestos deben ser considerados válidos estrictamente dentro de las condiciones de trabajo y experimentación aplicadas en esta investigación. Los resultados observados en el análisis de los metabolitos generados del proceso de biodegradación pueden servir de base para reconsiderar las interacciones entre el cambio de las características fisicoquímicas del BPC aminado y el incremento de su capacidad para ser biodegradado atribuyéndolas a algún cambio en la conformación de la molécula inducido por el propio grupo amino introducido. Este es uno de los aspectos fundamentales en los que se trabajó en esta investigación.

Por otra parte, los resultados pueden servir de base para extrapolar el estudio del comportamiento de biodegradación a otros compuestos aromáticos clorados utilizando reactores de biomembranas hidrófobas para su tratamiento.

Es importante hacer mención que en el momento final de este estudio, existen aún varios aspectos que han sido abordados de forma parcial sobre todo, en la caracterización fisicoquímica de los BPC aminados, por lo cual es necesario seguir profundizando la investigación en esta línea.

A continuación se exponen los resultados concretos que suponen nuevas aportaciones al tema de estudio; los apartados planteados, pretenden cubrir aspectos de carácter fundamental y aplicado.

TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO

En cuanto a la utilización del BPC aminado por los microorganismos como única fuente de carbono y nitrógeno se llega a las siguientes conclusiones:

- Entre los diversos temas de actualidad en tratamiento de BPCs, uno de los menos abordado es el de realizar modificaciones en sus propiedades mediante tratamientos químicos con el objetivo de cambiar las principales características que inhiben su biodegradación y éste es uno de los aspectos fundamentales en los que se ha trabajado en presente estudio.
- En el proceso de aminación, la mayor parte de los congéneres son diaminados, lo que representa otros sitios activos para el ataque de la molécula por las diferentes enzimas biológicas.

- El tratamiento químico de aminación de la molécula de BPCs favorece la biodegradación de los diferentes congéneres ya que no sólo se consigue una mayor "aceptación" de los microorganismos para utilizarlo como fuente de carbono y nitrógeno sino que además, el grupo amino puede ser fácilmente desplazado por grupos hidroxilos dentro del medio lo que representa la oportunidad para otros sitios susceptibles de ataque enzimático en la molécula.
- El rendimiento del tratamiento químico de nitración y aminación proporcionó buenos resultados Sin embargo, los congéneres 2,2',4,4',6-pentaclorobifenilo, 2,2',3,3',4,4'- y 2,2',3,3',6,6'-hexaclorobifenilos, 2,2',3,4,4',5,6-heptaclorobifenilo, 2,2',3,3',4,4',5,5'-octaclorobifenilo y 2,2',3,3',4,4',5,6-octaclorobifenilo son isómeros que no se han nitrado ni aminado, debido a que sus posiciones adecuadas para ello, estaban ocupadas o presentan impedimentos estéricos.
- En los resultados de la caracterización fisicoquímica, los BPCs nitrados presentan un incremento en el rango de temperatura en los puntos de ebullición y fusión en comparación de los BPC puros, debido a la naturaleza del grupo nitro introducido en la molécula.

CROMATOGRAFÍA

Las principales conclusiones que se extraen del trabajo realizado son las siguientes:

- Se ha realizado por primera vez la nitración y aminación de congéneres de BPC puros lo que se presume, son nuevos registros CAS.
- Se han separado e identificado por primera vez mediante CG los BPC nitrados y aminados lo que confirma que la CG/MS es efectivamente una buena alternativa en combinación con la RMN para obtener la descripción analítica de los BPCs nitrados y aminados.
- Los isómeros de BPCs elegidos para la cuantificación, se encuentran también en las muestras de BPC extraídas del aceite dieléctrico.
- Las complicaciones derivadas de trabajar con mezclas de BPCs aminados, crean un serio problema en el análisis cuantitativo, ya que éstos implican la determinación de diferentes congéneres e isómeros de estos compuestos; incluso en ocasiones, aún en los BPC puros es difícil distinguir entre dos isómeros del mismo número de cloros sólo por el espectro de masas, ya que la mayor interferencia está dada por el llamado efecto *orto* y en estos, casos ha sido útil recurrir a los tiempos de retención para facilitar la identificación.
- Los resultados obtenidos, demuestran que el segundo programa de temperatura utilizado en el cromatógrafo de CG/EM, permite obtener los mejores resultados de separación e identificación y de un modo rápido y sencillo, proporciona información sobre el rendimiento de la nitración y aminación de los BPCs. En consecuencia, es el método más eficaz hasta el momento para el análisis de los compuestos estudiados y el que proporciona resultados más fiables. Aunado a que los datos pueden ser confirmados posteriormente por el análisis de resonancia magnética nuclear.

BIODEGRADACIÓN

En relación con los resultados de los análisis de la biodegradación de los BPCs aminados se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- El doble objetivo perseguido de realizar el pretratamiento químico de nitración y aminación y realizar a su vez el tratamiento biológico al BPCs aminado, ha facilitado su biodegradación.
- Durante el tratamiento aerobio, los BPCs aminados se degradan con mayor facilidad que los BPC puros. Si bien, la mayor parte de los BPCs son biodegradados en las condiciones de trabajo, algunos congéneres permanecen inalterados en el medio en diferentes concentraciones.
- Al parecer la biodegradación aerobia, es más efectiva que el tratamiento anaerobio tanto en la reducción de los parámetros globales como en la eliminación de cada uno de los congéneres; pero se requiere de realizar un tratamiento en continuo para su verificación.

Bioensayos

- En los bioensayos utilizando la mezcla de bacterias, el isómero 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenilo no se biodegrada aún al séptimo día, al igual que los compuestos: 1,2,4-triclorobenceno y 1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno. Sin embargo, el compuesto 2,3,4-tricloroanilina se biodegrada en su totalidad.
- El hongo *Phanerochaete chrysosporium* es el microorganismo que genera el mayor número de metabolitos de la biodegradación de BPC aminado. Los compuestos 1,2,4-tricloro-5-nitrobenceno; 1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno, 2,3,4-tricloroanilina son biodegradados en su totalidad. Los isómeros 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenilo; 3,3',4,4',5,5',6-heptaclorobifenilo; 2,2',3,4,4',5,6-heptaclorobifenilo y 2,2',3,4,4',5,6-heptaclorobifenilo también son degradados al séptimo día. Sin embargo, el isómero 3,3',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo permanece acumulado en el medio.
- Utilizando la mezcla de hongos, todos los compuestos 2,3,4-tricloroanilinas y los isómeros 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenilos son biodegradados en su totalidad.
- En los bioensayos utilizando la mezcla de todos los microorganismos, los congéneres 2,2',4,4',6-pentaclorobifenilos; 2,2',3,4',5,6-hexaclorobifenilo, 2,2',3,3',4,6'-hexaclorobifenilo, 2,2',2,3,4',5,6-heptaclorobifenilo son biodegradados en su totalidad. Sin embargo, los isómeros 2,2',3,4',5,6-hexaclorobifenilo y 2,2',3,4,4',5,6-heptaclorobifenilo además de los compuestos 1,2,3-tricloro-4-nitrobenceno, 2,4,5-tricloroanilina y 1,2,4-triclorobenceno permanecen sin ser biodegradados al séptimo día de tratamiento.
- El análisis de comparación de los 4 bioensayos, los compuestos que no son biodegradados por un tipo de microorganismo lo son por otro, por ejemplo: los compuestos 1,2,4-triclorobenceno y 1,2,3-tricloronitrobenceno que no son biodegradados por la mezcla de bacterias, son metabolizados completamente por *Phanerochaete chrysosporium*; el isómero

22',34, 4'5'-hexaclorobifenilo que no es biodegradado por éste, lo es por la mezcla de hongos.

Reactor Aerobio

- Mediante el tratamiento con el reactor aerobio, se consigue la eliminación efectiva de todos los congéneres tetra y pentaclorados.
- El tetraclorobifenilo aminado es el compuesto que presenta mayor velocidad de degradación frente a los congéneres hexa y heptaclorados que se degradan más lentamente y permanecen acumulados en el medio. Los congéneres octaclorados son degradados en períodos posteriores a 40 días de tratamiento.
- Durante la degradación aerobia, se generan compuestos clorobencenos, cloronitrobenzenos y anilinas producto de la ruptura de al menos uno de los anillos, pero son degradados consecutivamente en el mismo reactor.
- Se comprueba que cuanto mayor es el número de átomos de cloro, menor es la eliminación conseguida en el tratamiento aerobio (debido a los impedimentos estéricos para el ataque enzimático).
- El proceso de biodegradación del BPCs aminado, incluye una serie de reacciones enzimáticas que fragmentan la molécula y que posteriormente experimentan un re-agrupamiento por reacciones radicalarias; los subcompuestos así formados, dan origen a hidrocarburos de cadena larga tales como hexatriacontanos, tetracontanos etc.
- Otro tipo de subproductos generados en la biodegradación aerobia son compuestos hidroxilados y oxigenados como: 3,5,5'-trimetil 2-ciclohexanona, 2,2'-dimetil-ciclohexanol y 2-sec-butil ciclopentanona compuestos característicos sobre los cuales actúan las enzimas oxigenasas.
- Se ha obtenido la identificación cromatográfica de los metabolitos generados, algunos de los cuales no se habían reportado anteriormente, pero no ha sido posible seguir la secuencia enzimática de biodegradación.
- El procedimiento seguido y los datos obtenidos del proceso en la presente investigación, son de gran utilidad para realizar estudios de biodegradación de otros compuestos cloroaromáticos como clorobencenos, cloronitrobenzenos y cloroanilinas.
- No ha sido posible realizar la modelación del proceso de biodegradación en los reactores debido a que el diseño del reactor no permite realizar la determinación de parámetros necesarios para el modelo propuesto por Pavasant (1997) tales como: la concentración de la biomasa suspendida, el crecimiento y concentración de sólidos en la biopelícula, coeficientes de difusión del BPCs aminado y fuerza cortante (hidrodinámica del medio).

Reactor Anaerobio

- El tratamiento anaerobio utilizando BPCs aminados, es más efectivo que los reportados por los diferentes autores utilizando BPC puro.
- Mediante el tratamiento con reactor anaerobio, se consigue la eliminación de todos los isómeros tetra-, penta- y octaclorobifenilos.
- Los isómeros 129, 153, 149, 137 181, 185 y 195 de los hexa, hepta y octaclorobifenilos son los compuestos que presentan una mayor resistencia a la biodegradación en el reactor anaerobio.
- Durante la biodegradación se originan los isómeros 99, 98, 103, 141, 169, 131, 189, 178 y 185, pero son también biodegradados en el mismo reactor.
- Durante la degradación anaerobia, se generan también compuestos clorobencenos, cloronitrobenzenos y cloroanilinas, producto de la ruptura de al menos uno de los anillos pero son degradados consecutivamente en el mismo reactor.

REACTORES DE BIOMEMBRANAS

Los resultados de la presente investigación, demuestran que los reactores de biomembrana aerobio y anaerobio constituyen una excelente tecnología para la biodegradación de BPCs. Hecho que constituye una innovación de aplicación de este tipo de reactores en la biodegradación de tales compuestos.

En relación a la efectividad de los reactores de biomembrana utilizados en los tratamientos aerobio y anaerobio de degradación, se ha llegado a las siguientes conclusiones.

- La utilización de reactores aerobios de biomembrana permiten la degradación de los BPCs aminados y de sus metabolitos con buenos rendimientos, dada la eficiente separación y dosificación del contaminante evitando problemas de toxicidad por altas concentraciones en el medio para los microorganismos.
- El rendimiento del proceso de biodegradación en el reactor aerobio es del 59.9 % para los pentaclorobifenilos, 56.78% para los hexaclorobifenilos y 56.85% para los heptaclorobifenilos presentes en la muestra. No fue posible realizar la cuantificación de los octaclorobifenilos, ya que no ha sido posible realizar la recta de calibrado debido a que se requiere de una concentración mayor a 10 ppm de la que existe en la solución patrón, debido a que por debajo de esta concentración, la respuesta de este tipo de congénere es apenas perceptible por el detector.
- El rendimiento del proceso de biodegradación en el reactor anaerobio es del 63 % para los pentaclorobifenilos, 49.87% para los hexaclorobifenilos y 49.97% para los heptaclorobifenilos presentes en la muestra. De igual manera no ha sido posible realizar la cuantificación de los octaclorobifenilos.

- Se ha podido constatar que factores tales como velocidad de recirculación y la turbulencia por oxigenación en el reactor aerobio, afectan considerablemente el proceso de biodegradación.
- La biopelícula aerobia formada, es sumamente sensible a la turbulencia del medio por recirculación y oxigenación lo que provoca problemas de desprendimiento de la biopelícula.

PARÁMETROS DE CONTROL

En relación a la influencia de los diferentes parámetros de control en los dos reactores y el estudio global comparativo de los distintos ensayos se llega a las siguientes conclusiones:

- Mediante los ensayos, se ha demostrado que el control de los parámetros fisicoquímicos condicionan de modo notable el rendimiento del proceso de biodegradación.
- La biodegradación del BPC aminado en los reactores depende en gran manera de mantener las condiciones del pH del medio cercano a la neutralidad.
- La constante de degradación de primer orden para los diferentes congéneres es mayor cuando el suministro de oxígeno en el reactor aerobio es cercano a la saturación y la temperatura del medio se encuentra en 24°C.
- La reducción de la DQO y del COT es ligeramente mayor cuando se trabaja en condiciones aerobias.
- La reducción de los parámetros globales indicativos de contaminación (DQO, COT) y Cloruros generados tiene un comportamiento decreciente en los dos tipos de reactores. Como media, la disminución de la DQO es del 25% en el reactor aerobio y del 57% en el anaerobio; en ambos reactores el valor promedio de disminución es de 45%. La eliminación de COT es superior al 70% en el reactor aerobio y 80% en el anaerobio.
- La gran concentración de cloruro en el medio es una evidencia de la biodegradación parcial de los compuestos BPCs aminados y un parámetro adecuado para realizar el balance de masas. La generación de cloruros en ambos reactores tiene un comportamiento similar.
- Aunque la biodegradación de los BPCs se considera completa cuando los anillos se llevan hasta el estado de mineralización o bien, se convierten en metabolitos intermedios, la eliminación de Cl del anillo es el punto crucial, problema que ha sido superado en la investigación por la evidencia de gran concentración de cloruros en el medio, sin embargo, es difícil determinar si el proceso ha ocurrido en los estados iniciales de biodegradación o durante la biodegradación de los metabolitos generados en el mismo reactor.
- Las variaciones observadas en la determinación de los parámetros en el presente estudio, es un tanto difícil de interpretar cuando se intenta comparar con los resultados obtenidos por los diferentes autores, ya que en varios trabajos reportados las condiciones de operación no están lo suficientemente descritas.

Como consecuencia de los trabajos realizados, se abren nuevas líneas de investigación cuyo alcance se resumen en los siguientes puntos:

- Utilizar una nueva técnica cromatográfica para determinar BPCs nitrados y aminados por CG/MS.
- Realizar la caracterización fisicoquímica de los BPC aminados.
- Utilizar procesos anarobios-aerobio combinados con recirculación.
- Estudiar la viabilidad económica de los distintos procesos del tratamiento.
- Realizar los balances de materia en función de un elemento determinado, considerando los tratamientos fisicoquímicos y biológicos.

Capítulo XVI.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta el elevado costo de los procesos de tratamiento fisicoquímicos de BPCs actuales y la gran cantidad que permanece almacenada sin tratamiento alguno, se recomienda la creación de una infraestructura de gestión de BPCs basados en análisis de beneficio/costo y en concordancia con el estado actual de la biotecnología para la eliminación de este tipo de compuestos.

Es recomendable seguir impulsando la investigación de nuevas tecnologías que permitan su eliminación ambiental y económicamente aceptables; reforzando el estudio de los procesos de tratamiento biológico para la eliminación de BPCs. Se requiere además, desarrollar un enfoque integral para evaluar el re-diseño de los procesos aerobio y anaerobios optimizando cada etapa en una forma aislada y como sistema integral.

Llegado a este punto, es recomendable llevar la investigación a escala piloto, ya que no existen sustitutos de ésta para la evaluación de un programa de biodegradación de BPCs a gran escala, debido a que proporciona demasiada cantidad de información para realizar ensayos más parecidos a la realidad y permite la resolución de los problemas de equipamiento y reactivos; lo que ayuda a optimizar el rendimiento y fiabilidad del proceso, representando un ahorro de varias veces su costo. Además, con base en el desarrollo de los ensayos y una vez conseguido a escala piloto el dimensionamiento adecuado, pasar a capacidades de tratamiento mayor es más fácil y sólo se requiere realizar el cambio de escala.

Es recomendable, realizar el proceso de biodegradación de forma secuencial realizando la construcción en un solo tren de tratamiento anaerobio-aerobio, con recirculación en ambos procesos para incrementar la velocidad de biodegradación de los metabolitos generados en los mismos.

Para hacer más eficiente el proceso de tratamiento, es recomendable mejorar algunos aspectos del diseño y operación de los reactores y el material utilizado en su construcción. Se recomienda además optimizar el rendimiento del proceso incrementando el número de tubos de membrana, teniendo en cuenta para ello: el espesor de la biopelícula limitado por los fenómenos de difusión, el área específica, los requerimientos de oxígeno y la concentración y recirculación del BPC aminado en el sistema.

Es recomendable además, realizar la oxigenación del sistema en la línea de recirculación para evitar problemas de desprendimiento de la biopelícula por la excesiva turbulencia.

El nuevo diseño, deberá considerar dispositivos adecuados que permitan la determinación periódica de parámetros tales como la concentración de la biomasa suspendida, espesor y concentración de sólidos en la biopelícula mediante el aditamento de soporte extraíble pero a la vez deberá ser capaz de mantener condiciones de hermeticidad del sistema mediante juntas tóricas.

Aunque el presente trabajo de investigación constituye una contribución al estudio de un caso particular de biodegradación de BCPs aminados de los que se ha obtenido buenos resultados; quedan varias cuestiones aún por resolver, entre las que se recomienda realizar el estudio de los mecanismos enzimáticos que intervienen en el proceso de biodegradación de la molécula del BPC aminado para poder realizar el diseño del proceso biotecnológico más adecuado a implementar, lo que constituye una de las líneas de investigación a desarrollar a futuro.

PROPUESTA DE FUTURAS INVESTIGACIONES A REALIZAR

En cuanto al proceso de nitración, sería conveniente realizar la nitración en condiciones más drásticas utilizando una mezcla sulfonítrica (ác. nítrico fumante/ac. sulfúrico concentrado), verificando el incremento de la eficiencia del proceso por comparación con el rendimiento de la nitración de los resultados obtenidos en la presente investigación, tratando de reducir la complejidad del tratamiento químico.

Se recomienda realizar la nitración y aminación de todos los estándares de Aroclor[®] para tener mejores puntos de referencia en el momento de realizar el análisis de los resultados de los compuestos nitrados y aminados. Además, es conveniente realizar las determinaciones, con patrones internos a fin de determinar las condiciones adecuadas de tiempo de retención, temperaturas y tipo de columna cromatográfica empleada.

Se recomienda realizar un análisis de los gases generados durante la nitración y aminación para verificar la eliminación de Cl⁻ durante cada uno de los procesos.

Así mismo, es de suma importancia realizar el tratamiento de los residuos generados durante todos y cada uno de los procesos realizados en la investigación.

En los procesos cromatográficos la respuesta de los BPCs aminados, al detector de masas, es distinta según el número de cloros y número de grupos amino introducidos e incluso, dentro de los mismos congéneres las diferencias en cuanto a respuesta son notables, razón por la cual, es recomendable realizar la cuantificación con isómeros individuales utilizando columnas capilares de 50 m y un programa de temperatura más adecuado.

Es conveniente disponer de un equipo de cromatografía de gases-masas y material necesario para desarrollar un programa cromatográfico con el cual, obtener una mejor separación y resolución de los picos para realizar la identificación de los isómeros de los BPC nitrados y aminados.

Una vez contando con el equipo adecuado, es recomendable examinar en primer lugar de un modo cualitativo las relaciones entre la estructura y el orden de elución de los diferentes congéneres nitrados y aminados obteniendo reglas comparables a las descritas en los programas cromatográficos comúnmente aceptados para determinar BPC puros. Y posteriormente, se deberá estudiar cuantitativamente la relación entre el comportamiento cromatográfico y su estructura, lo que es totalmente nuevo en el campo de análisis cromatográfico de los BPCs.

Por otra parte, las distintas conformaciones que puede presentar una molécula de BPC nitrada o aminada, da lugar a necesidad de investigar un conjunto de descriptores diferentes para cada congénere ya que las diferencias en las propiedades fisicoquímicas que le puede conferir el grupo amino sustituyente en la conformación de la molécula, pueden modificar grandemente las sus características de biodegradabilidad; razón por la cual, es recomendable realizar una exhaustiva caracterización para detallar los parámetros estructurales que definan la nueva molécula de la forma más completa posible.

Es recomendable realizar la caracterización más completa de la biopelícula generada del reactor anaerobio con el objetivo de diferenciar y comprobar la existencia de las capas aerobia y anaerobia dentro de la misma biopelícula.

Se recomienda realizar la caracterización del lodo biológico generado durante el tratamiento con el objeto de determinar la acumulación de compuestos tóxicos en la biopelícula.

Es conveniente realizar la determinación de la ruta o rutas metabólicas de acción utilizada por los microorganismos en la biodegradación de los BPCs aminados en el reactor aerobio con el objetivo de confirmar la eliminación de cloros durante el proceso de sustitución de los grupos aminos de la molécula por grupos hidroxilos.

Dentro de una perspectiva más amplia, se recomienda seguir profundizando y realizando investigación mediante el desarrollo de planes integrales de biodegradación de residuos industriales organoclorados utilizando los reactores de biomembrana como una tecnología altamente rentable y eficaz.

Finalmente, se recomienda seguir realizando la formación de especialistas altamente cualificados en las diferentes áreas de la ingeniería ambiental capaces de dirigir, asesorar y realizar investigación en el campo del biotratamiento de residuos industriales peligrosos. Para ello, es recomendable disponer de una sección de laboratorio, material y equipos adecuados para realizar este tipo de investigación o implementar mecanismos de cooperación entre diferentes dependencias universitarias, así como motivar la cooperación internacional con el fin de unir esfuerzos académicos optimizando recursos materiales y humanos.

Capítulo XVII.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

ARTÍCULOS:

Abramovicz D.A.; Brennan M.J.; VanDort H.M.; Gallagher E.L., 1993., Factors influencing the rate of polychlorinated biphenyls dechlorination in Hudson Rivers sediments., *Environ. Sci. Technol.*, 27:1125-1131.

Abramowicz D., 1990., Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: A review., *Biochemistry*, 10:241-249.

Adriens P.; Focht D.D., 1990., Continuous coculture degradation of selected polychlorinated biphenyl congeners by *Acinetobacter sp.* in a aerobic reactor system., *Environ. Sci. Technol.*, 24(7):1042-1049.

Ahlingen B. and Jensen S., 1970., Reverse liquid-liquid partition in determination of polychlorinated biphenyls (PCB) and chlorinated pesticides in water., *Anal. Chem.*, 42(13):1483-1486.

Ahmed M. Focht D.D., 1973., Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter.*, *C. J. Microbiol.*, 19:47-52.

Ahnoff M.; Josefsson B., 1974., Simple apparatus for on-site continuous liquid-liquid extraction of organic compounds from natural waters., *Anal. Chem.*, 46:658-663.

Ahnoff M.; Josefsson B., 1975., Clean-up procedures for PCB analysis on river water extracts., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 13:159-166.

Albertson O.; DiGregorio D., 1975., Biologically mediated inconsistencies in aeration equipment performance., *Journal WPCF.*, 47:967-988.

Albro P.W.; Corbett J.T.; Schroeder J.L., 1981., Quantitative characterization of polychlorinated biphenyls (Aroclors 1248,1254 and 1260) by gas chromatography using capillary columns., *Journal of Chromatography.*, 205:103-111.

Albro, P.W.; Parker, C.E. 1979. "Comparison of compositions of Aroclor 1242 and Aroclor 1016., *Journal of Chromatography.* 169:161-166.

Alder A.C.; Haggblom M.M.; Oppenheimer S.R.; Young L.Y., 1993., Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls in anaerobic sediments., *Environ. Sci. Technol.*, 27:530-538.

Alford-Stevens A.L.; Budde W.L.; Bellar T.A., 1985., Interlaboratory study on determination of polychlorinated biphenyls in environmentally contaminated sediments., *Anal. Chem.*, 57(24):2452-2457.

Alford-Stevens L.A.; Bellar T.A.; Eichelberg W.J. and Budde L.W., 1986., Accuracy and precision of determinations of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyl with automated interpretation of mass spectrometric data., *Anal. Chem.*, 58(9):2022-2029.

Alford-Stevens L.A.; Bellar T.A.; Eichelberger W.J.; Budde L.W., 1986b., Characterization of commercial Aroclors by automated mass spectrometric determination of polychlorinated biphenyls by level of chlorination., *Anal. Chem.*, 58(9):2014-2022.

Alford-Stevens, L.A., 1986a., Analyzing PCB's. Basic information about PCB's and how they are identified and measured., *Environ. Sci. Technol.*, 20(12):1194-1199.

- Amour J.A.; Burke J.A., 1970., Method for separating polychlorinated biphenyls from DDT and its analogs., *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 53:761-68.
- Anderson J.J.; Dagley S., 1980., Catabolism of aromatic acids in *Trichosporium cutaneum*., *J. Bacteriol.*, (141):534-543.
- Andrew G.F., 1980., The effects of cells on oxygen transfer coefficients I. Cell accumulation around bubbles., *Chem. Eng. J.*, 29:B39.
- Angel A., 1970., Studies in the compartmentation on lipid in adipose cells I: subcellular distribution, composition and transport on newly synthesized lipid: liposomes., *J. Lipid. Res.*, 11:420-432.
- Arjmand M.; Sandermann H.J., 1985., Mineralization of chloroaniline/lignin conjugates and of free chloroanilines by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*., *J. Agric. Food. Chem.*, 33:1055-1060.
- Arjmand M.; Sandermann H.J., 1986., Plant biochemistry of xenobiotics. Mineralization of chloroaniline/lignin metabolites from wheat by the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*., *Z. Naturforsch.*, 41:206-214.
- Atkinson B., 1974., The significance of microbial film in fermenters., *Advance in Biotechnol. Bioeng.*, 3:221-277.
- Atlas E.; Giam. C.S., 1980., Global transport of organic pollutants: Ambient concentration in the remote marine atmosphere., *Science*, 211:163-165.
- Bachofer R.; Lingerns F.; Schaefer W., 1975., Conversion of aniline into pyrocatechol by a *Nocardia sp.*, Incorporation of oxygen-18.
- Ballschmiter K.; Uglert C.; Heinzmann P., 1977., Formation of chlorophenols by microbial transformation of chlorobenzene., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 16:645.
- Ballschmiter K.; Zell M., 1980., Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by gas capillary chromatography. Composition of technical Aroclor and Clophen- PCB mixtures., *Fresenius'z Anal. Che.*, 302:20-31.
- Ballschmiter K.; Unglert K.C.; Neu H.T., 1977. Abbau von chlorierten Aromaten: Mikrobiologischer Abbau der polychlorierter Biphenyle (PCB). III. Chlorierte Benzoesäuren als Metabolite der PCB., *Chemosphere*, 1:51.
- Bartholome W.H., 1950., Mass transfer and agitational in submerged fermentation., *Ind. Eng. Chem.*, 42:1901.
- Baxter R.A.; Gilbert P.E.; Lidgett R.A.; Mainprize J.H.; Vodden H.A., 1975., The degradation of polychlorinated biphenyls by microorganisms., *Sci. Total Environ.*, 4:53.
- Bayley R.C.; Dagley S., 1969., Oxobenzoic acids as metabolites in the bacterial degradation of catechols., *Biochem. J.*, (111):303-307.
- Beck H.; Mathar W., 1987., Isomer-specification of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD) and polychlorinated dibenzofurans (PCDF) in human and food samples., *VDI-Ver. 639(dioxin)*359-382.
- Bedar D.L., 1990., Bacterial transformation of polychlorinated biphenyls., *Advan. Appl. Biotechnol. Ser. Biotechnol. Biodegradation*., 369-388.
- Bedard D.L.; Haberl M.L., 1990., Influence of chlorine substitution pattern on the degradation of polychlorinated biphenyls by eight bacterial strains., *Microb. Ecol.*, (29):87-102.
- Beer D.; Stoodley P.; Lewandowsky Z., 1994., Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport., *Biotechnol. And Bioeng.*, 43(11):1131-1138.

- Bennet G.F., 1964., Oxygen transfer mechanisms in the gluconic acid fermentation by *Pseudomonas ovalis*., *Biotechnol. And Bioeng.*, 6:347-360.
- Bidleman T.F.; Christensen E.J.; Billings W.N.; Leonard R., 1981., Atmospheric transport of organochlorines in the North Atlantic Gyre., *J. Marine Res.*, 39(39):443-464.
- Bidleman T.F.; Onley E.C., 1974., High-volume collection of atmospheric polychlorinated biphenyls., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11:442-450.
- Bielaszczyk E.; Czerwinska E.; Janko Z.; Kotarski A.; Kowalik R.; Kwiatkowski M.; Zoledziowska J., 1967., Aerobic reduction of some nitrochloro-substituted benzene compounds by microorganisms., *Acta Microbiol. Pol.*, (16):243-248.
- Billings R.E.; McMahon R.E., 1978., Microsomal biphenyl hydroxylation the formation of 3-hydroxylation the formation of 3-hydroxy biphenyl and biphenyl catechol., *Mol. Pharmacol.*, 14(1):145-154.
- Blakemore R.P.; Carey A.E., 1978., Effect of polychlorinated biphenyls on growth and respiration of heterotrophic marine bacteria., *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:323.
- Bollag J.M.; Russel S., 1976., Aerobic versus anaerobic metabolism of halogenated anilines by a *Paracoccus sp.*, *Microbiol. Ecol.*, 3:65-73.
- Bopp L.H., 1986., Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* Strain LB400., *J. Ind. Microbiol.*, 1:23-29.
- Bopp R.F.; Simpson H.J.; Deck B.I.; Kostyk N., 1984., The persistence of PCB components in sediments of the lower Hudson., *Northeast Environ. Sci.*, 3:180-184.
- Borlakoglu J.T.; Walker C.H., 1989., Comparative aspects of congeners specific PCB metabolism., *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 14:127-131.
- Bosma T.N.P.; VanDer Meer J.R.; Schraa G.; Tros M.E.; Zehnder A.J.B., 1988., Reductive dechlorination of all trichloro- and dichlorobenzene isomers., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 53:223-229.
- Bourquin A.W.; Cassidy S., 1975., Effect of polychlorinated biphenyl formulations on the growth of estuarine bacteria., *Appl. Microbiol.*, 29:125.
- Bouwer E.J.; McCarty., 1985., Utilization rates of trace halogenated compounds in acetate supported biofilms., *Biotechnol. Bioeng.*, 27:1564-1571.
- Boyd S.A.; Shelton D.R.; Berry D.; Tiedje J.M., 1983., Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge., *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:50-54.
- Boyd S.A.; Sun S., 1989., Residual petroleum and polychlorinated oils as sorptive phases for organic contaminants in soils. *Environ. Sci. Technol.*, 24:142-144.
- Boyle A., 1992., Bacterial PCBs biodegradation. *Biodegradation.*, (3):285-298.
- Bradfield C.A. Kende A.S.; Poland A., 1988a., Kinetic and equilibrium studies of Ah receptor-ligands bindings: use of [125I]2-iodo-7,8-dibromodibenzo-p-dioxin., *Mol. Pharmacol.*, 34:229-237.
- Bradfield C.A.; Poland A., 1988b., A comparative binding assay for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related ligands of the Ah receptor., *Mol. Pharmacol.*, 34:682-688.
- Brinkman U.A.; De kok A.; De Vries G.; Reyner H.G.M., 1976., High-speed liquid chromatography of polychlorinated biphenyls., *J. Chromatogr.*, 12:101-110.

- Brinkman U.A.; Seetz J.W.F.L.; Reymer H.G.M., 1976., High-speed liquid chromatography of polychlorinated biphenyl and related compounds., *J. Chromatogr.*, 116:353-363.
- Brodsky J.; Ballschmiter K., 1988., Reverse-phase liquid chromatography of PCB as a basis for the calculation of water solubility and log K_{ow} for polychlorobiphenyls., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 331(3-4):295-301.
- Brookes R.P.; Livingston., 1994., Biological detoxification of 3-chloronitrobenzene manufacture wastewater in a extractive membrane bioreactor, *Wat. Res.*, 28(6):1347-1354.
- Brown J.F.; Bedard D.L.; Brennan M.J.; Carnahan J.C.; Feng H.; Wagner R.E., 1989., Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments., *Science.*, 236:709-712.
- Brown J.F.; Wagenr R.E.; Feng H.; Bedard D.L.; Brennan M.J.; Cernahan J.C.; May R.J., 1987., Environmental dechlorination of PCBs., *Environ Toxicol. Chem.*, 6:579-593.
- Brown J.F.; Wagner R.E.; Bedard D.L.; Brennan M.J.; Carnahan J.C.; May R.J.; Tofflemire T.J., 1984., PCB transformations in upper Hudson sediments., *Northeast Environ. Sci.*, 3:167-179.
- Brownlow C.S.; Que Hee S.S., 1985., Comparison of solid sampling media for Aroclor 1242 vapor under dry and humid conditions., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 46:421-426.
- Bruhn C.; Bayly R.C.; Knackmuss H.J., 1988., The in vivo construction of 4-chloro-2-nitrophenol assimilatory bacteria., *Arch. Microbiol.*, (150):171-177.
- Brunner W.; Sotherland S.H.; Focht D.D., 1985., Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls in soils by analog enrichment and bacterial inoculation., *J. Environ. Quality.*, 14:324-328.
- Budiansaky S.; Josephson J., 1980., Waste disposal chemistry., *Environ. Sci. Technol.*, 14(5):508-510.
- Bungay H.R.; Masak R.D., 1981., Estimation of thickness of bacterial films an Air-water interfee., *Biotechnol. and Bioeng.*, 23:1155.
- Burse V.W. Kimbrough R.D. Villanueva E.C. Jennings R.W. Linder R.E.; Sovocool G.W., 1974., Polychlorinated biphenyls: storage distribution, excretion, and recovery: liver morphology after prolonged dietary ingestion. *Arch. Environ. Health.*, 29:301-307.
- Bush B.; Lo F.C., 1973., Thin-layer chromatography for quantitative polychlorinated biphenyls analysis., *Journal of chromatography.*, 77:377-388.
- Bush B.; Snow J.T.; Connor S., 1983., High-resolution gas chromatographic analysis of non-polar chlorinated hydrocarbons in human milk., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66:248-255.
- Byle A.W.; Blake C.K.; Price W.A.; May H.D., 1993., Effects of polychlorinated biphenyls congeners concentration and sediment supplementation on rates of methanogenesis and 2,3,6-trichlorobiphenyls concentration in an anaerobic enrichment., *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:3027-3031.
- Cain R.B., 1966., Utilization of anthranilic and nitrobenzoic acids by *Nocardia opaca* and a flavobacterium., *J.Gen. Microbiol.*, (42):219-235.
- Carey A.E.; Harvey G.R., 1978., Metabolism of polychlorinated biphenyls by marine bacteria., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 20:527.
- Carlson R.W. and DUBY R.T., 1973., Embryotoxic effects of three PCBs in the chicken., *Bull. Envir. Cont. Toxic.*, 9:261-264.

- Catalani D.; Colombi A.; Sorlini C.; Treccani V., 1973., Metabolism of biphenyl. 2-hydroxy-6-oxo-phenylhexa-2,4-dienoato: The *meta* cleavage products from 2,3-dihydroxybiphenyls by *Pseudomona putida*., *Biochem. J.*, 134:1063-1066.
- Catelani D.; Colombi A., 1974., Metabolism of biphenyls. Structure and physicochemical properties of 2-hydroxy-6-oxo-6phenylhexa-2,4-dienoico acid, the *meta*-clavage products from 2,3-dihydroxybiphenyls by *Pseudomona putida*., *Biochem. J.*, 143:431-434.
- Catelani D.; Sorlini C.; Treccani V., 1971., The metabolism of biphenyl by *Pseudomonas putida*., *Experientia*., 27:1173-1174.
- Cerniglia C.E.; Van Baalen C.; Gibson D.T., 1980., Oxidation of biphenyl by cyanobacterium, *Oscillatoria sp.*, strain JCM., *Arch. Microbiol.*, 125:203.
- Clark R.R.; Chain E.S.K.; Griffin R.A., 1979., Degradation of polychlorinated biphenyls by mixed microbial cultures., *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:680-685.
- Code of Federal Regulations. 1990. Protection of Environment. *Parts 700 to 189. U.S.A.*
- Colburn W.A.; Mathew H.B., 1979., Pharmacokinetics in the interpretation of chronic toxicity test: the last-in first-out phenomenon., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48:387-395.
- Collins G.B. Holmes D.C. and Jackson F.J., 1972., The estimation of polychlorobiphenyls., *J. Chromatography*., 71:443-449.
- Collinsworth W.L.; Chapman P.J.; Dagley S., 1973., Stereospecific enzymes in the degradation of aromatic compounds by *Pseudomona putida*., *J. Bacteriol.*, (113):922-931.
- Cooper S.D.; Moseley M.A.; Pellizzari E.D., 1985., Surrogate standards for the determination of individual polychlorinated biphenyls using high-resolution gas chromatography with electron capture detection., *Anal. Chem.*, 57(13):2469-2473.
- Corbett M.D.; Corbett B.R., 1981., Metabolism of 4-chloronitrobenzene by the yeast *Rhodospiridium sp.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:942-949.
- Corburn W.A.; Valdmanis A.I.; Chau S.Y.A., 1977., Evaluation of XAD-2 for multiresidue extraction of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls from natural waters., *Journal of the AOAC*., 60(1):224-228.
- Cordero, E., 1995., PCB: Un Riesgo a Evitar., *Residuos. Medio Ambiente*., España., 5(24):59-62.
- Crawford L.R., 1995., Biodegradation of nitrated munition compounds and herbicides by obligately anaerobic bacteria., pp. 87-98., *Biodegradation of nitroaromatic compounds*., Edited by J.C. Spain., Plenum Press, New York.
- Crawford R.L., 1975., A novel pathway for degradation of protocatechuic acid in a *Bacillus* species., *J. Bacteriol.*, (121):531-536.
- Crawford R.L.; Olson P.E.; Frick T.D., 1979., Catabolism of 5-chlorosalicylate by a *Bacillus* isolate from the Mississippi River., *Appl. Environ. Microbiol.*, (38):379-384.
- Chacko C.I.; Lockwood J.L.; Zabik M., 1966., Chlorinated hydrocarbon pesticides: degradation by microbes., *Science*., (154):893-895.
- Chakrabarty A.M., 1976., Plasmids in *Pseudomonas*., *Ann. Rev. Genet.*, 10:7.
- Chakrabarty, A.M., 1978., Molecular mechanisms in the biodegradation of environmental pollutants., *ASM News*., 44:687.

- Chapman P.J.; Ribbons D.W., 1974., Metabolism of resorcinolic compounds by bacteria. Alternative pathways for resorcinol catabolism in *Pseudomona putida*., *J. Bacteriol.*, (125):985-998.
- Chatterjee D.K.; Chakrabarty A.M., 1982., Genetic rearrangements in plasmids specifying total degradation of chlorinated benzoic acids., *Mol. Gen. Genet.*, 188:279.
- Chaudhary S.K.; Albro P.W., 1978., A convenient method for preparation of 2-amino-3',4,4',5-tetrachlorobiphenyl., *Org. Prep. Proced. Int.* 10(1):46-48.
- Chementator., 1993a., CaSiO₃ boasts 'six nines' in PCB destruction., *Chemical Engineering*, p 21.
- Chementator., 1993b., Supercritical CO₂ removes organic contaminants from soil., *Chemical Engineering*, p. 21.
- Chen G.H., 1989., Modelling of the simultaneous removal of organic substrates and nitrogen in a biofilm., *Wat. Sci. Tech.*, 21:791-809.
- Chen P.H.; Chang K.T.; Lu Y.D., 1981., Polychlorinated biphenyls and polychlorinated benzofurans in the toxic rice-bran oil caused PCB poisoning in Taichyung., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26(4):489-495.
- Chen P.H.; Graw J.M.; Wong C.K.; Chen C.J., 1980., Level and gas chromatography patterns of PCB in blood of patients after PCB poisoning in Taiwan., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 25:325-329.
- Chevreuil M.; Chesterikoff A.; Létolle R., 1988., First estimation of atmospheric pollution by polychloro biphenyls (PCB) in Paris France., *C.R. Acad. Sci. Sér. II.*, 306:1081-1086.
- Chevreuil M.; Chesterikoff A.; Létolle R.; Granier L., 1989., Atmospheric pollution and fallout by PCBs and organochlorine pesticides (Ile De France), *Water Air Soil Pollut.*, 43:73-83.
- Chevreuil M.; Granier L.; Chesterikoff A.; Létolle R., 1990., Polychlorinated biphenyls partitioning in waters from river, filtration plant and wastewater plant: the case for Paris (France), *Water Res.*, 24:1325-1333.
- Dan Rir Mer J.R.; Zehender A.J.B.; DeVoss W.M., 1991., Identification o a novel composite transposable element., *Tn5280*, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas sp.* Strain P51., *J. Bacteriol.*, 173:7077-7083.
- Daniels S.L., 1971., The adsorption of microorganisms on to solid surfaces: A review., *Dev. Ind. Microbiol.*, 13:211-253.
- DeFrank J.J.; Robbons D.W., 1977., *p*-Cymene pathway in *Pseudomona putida*: ring cleavage of 2,3-dihydroxy-*p*-cumate and subsequent reactions., *J. Bacteriol.*, (129):1356-1364.
- Denison M.S.; Vella L.M., 1990., The hepatic Ah receptor for 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxins: species differences in subunit dissociation., *Arch. Biochem. Biophys.*, 277:382.
- DeVoogt P., 1991., The determination of polychlorinated-biphenyls in waste mineral-oils a review., *Chemosphere.*, 23(7):901-914.
- Dewey O.R., Lyndsay R.V. & Hartley G.S., 1962., Biological destruction of 2,3,6-trichlorobenzoic acid in soil., *Nature (London)*, 195:1232.
- Di Bella G.; Daghetta A.; Riva A., 1989., Investigation of the presence of residues of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in fish from the rivers of Lombardy., *Ind. Aliment.*, 28:929-936.
- Dickhut R.M.; Andren A.W.; Armstrong D.E., 1986., Aqueous solubilities of six polychlorinated biphenyls congeners at four temperatures. *Environ, Sci. Technol.*, 20(8):807-810.

- Diunker J.C.; Bouchertall F., 1989., On the distribution of atmospheric polychlorinated biphenyl congeners between vapor phase, aerosol and rain., *Environ. Sci. Technol.*, 23:57-62.
- Diunker J.C.; Hillebrand M.T.J., 1983., Characterization of PCB components in Clophen formulations by capillarity GC-Mass and GC-ECD techniques., *Environ. Sci. Technol.*, 17:449-456.
- Diunker C.J.; Schulz E.D.; Patrick G., 1988., Multidimension a gas chromatography with electron capture detection for the determination of toxic congeners in polychlorinated biphenyl mixtures., *Anal. Chem.*, 60(5):478-482.
- Dodge R.H.; Cerniglia C.E.; Gibson D.T., 1979., Fungal metabolism of biphenyl., *Biochem. J.*, 178:223-230.
- Dolfing J.; Harrison B.K., 1992., The Gibbs free energy of formation of halogenated aromatic compounds and their potential role as electron acceptors in anaerobic environments., *Environ. Sci. Technol.*, 26:2213-2218.
- Dolfing J.; Tiedje J.M., 1991., Influence of substituents on reductive equivalents in the reductive dehalogenation of 3-chlorobenzoate analogs., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:820-824.
- Donnelly K.C.; Kellor T.; Akgerman A.; Irvin T.R., 1987., Mutagenic potency of binary-mixtures of polycyclic aromatic and nitroaromatic hydrocarbons., *Environmental Mutagenesis, Meeting Abstract*. 9(8):51-52.
- Dorn E.; Hellwigm M.; Knackmus H.J., 1974., Isolation and chracterization of a 3-chlorobenzoate degrading Pseudomonas., *Arch. Microbiol.*, 99:61.
- Doucette W.J.; Andrew A.W., 1988., Aqueous solubility of selected biphenyl, furan and dioxin congeners. *Chemosphere*, 17(2):243-252.
- Dunnivan F.M.; Elzerman A.W., 1988., Determination of polychlorinated biphenyls in sediments, using sonication extraction and capillary-column gas chromatography- electron capture detection with internal standard calibration., *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71:551-556.
- Dunnivant D.M.; Elzerman A.W., 1988., Aqueous solubility and Henry's Law Constant data for PCBs congeners for evaluation of quantitative structure-property relationships (QSPRs) *Chemosphere*, 17(3):525-541.
- Durell S.G.; Sauer C.T., 1990., Simultaneous dualcolumn dualdetector gas chromatographic determination of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in environmental samples., *Anal. Chem.*, 62(17):1867-1871.
- Durrel, S.J.; Schulz, E.D.; Petrick, G. 1988., Multidimension a gas chromatography with electron capture detection for the determination of toxic congeners in polychlorinated biphenyls mixtures., *Anal. Chem.*, 60(5):478-482.
- Eadsforth C.V.; Logan C.J.; Page J.A.; Regan P.D., 1985., *n*-Butylglycidyl ether: the formation of a novel metabolite of an epoxide., *Drug. Metab. Disposit.*, (13):263-264.
- Eduljee E. Badsha K.; Price L., 1985., Enviromental monitoring for PCB and heavy metals in the vicinity of a chemical waste disposal facility-I., *Chemosphere*, 14:1371-1382.
- Elder D., 1976., PCBs in N.W. Mediterranean coastal waters., *Marine Pollution Bulletin.*, 7(4):63-64.
- Environmental Health Criteria 88. Polychlorianted biphenyls and terphenyls., *World Health Organization, Geneva*, 1989.
- Evans P.J.; Mang D.t.; Kim K.S.; Young L.Y., 1990., Anaerobic degradation of toluene by a denitrying bacterium., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:1139-1145.
- Evans W.C., 1977., Biochemistry of the catabolism of aromatics compunds in anaerobic environments., *Nature (London)*, (270):17-22.

- Fathepure B.Z.; Vogel T.M., 1991., Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-state biofilm reactor., *Appl. Environm. Microbiol.*, 57:3418-3422.
- Fava F.; Cinti S.; Marchetti L., 1993., Dechlorination of Fenchlor-54 and a synthetic mixture of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38:808-814.
- Fernández P. Porte C. Barceló D. Bayona J.M.; Albaigés J., 1988., Selective enrichment procedures for the determination of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environment samples by gel chromatography., *J. Chromatogr.*, 456:155.
- Fernando T.; Bumpuns J.A.; Aust S.A., 1990., Biodegradation of TNT (2,4,6-tri- nitrotolueno) by *Phanerochaete chrysosporium*., *Appl. Environ. Microbiol.*, (56):1666-1671.
- Finaly D.J.; Siff F.H.; DeCarlo V.J., 1976., Review of PCB levels in the environment., *EPA-560/7-76-001; NTIS No. PB-253735*.
- Finch S.R. Lavigne D.A.; Scott R.P.W., 1990., One example where chromatography may not necessarily be the analytical methods., *J. Chromatogr. Sci.*, 28:351-356.
- Focardi S. Fossi C. Leonzio C.; Romei R., 1986., PCB congeners, hexachlorobenzene, and organochlorine insecticides in human fat in Italy., *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 36:644.
- Foreman W.T and Bidleman T.F., 1985., Vapor-pressure estimates of individual polychlorinated-biphenyls and commercial fluids using gas-chromatographic retention data., *Journal of Chromatography.*, 330(2):203-216.
- Forgue S.T.; Allen J.R., 1982., Identification of an arene oxide metabolite of 2,2',5,5'-tetrachloro biphenyl by a gas chromatography mass spectroscopy., *Chem-Biol. Interact.*, 40(2):233-246.
- Freitas dos Santos M.L. Livingston G.A., 1995., Membrane-Attached biofilms for VOC wastewater treatment I: Novel in situ biofilm thickness Measurement technique., *Biotechnol. and Bioengineering.*, 47., pp.82-89.
- Fritz A.K.; Su T.M., 1978., The isolation and Characterization of bacteria that degrade polychlorinated biphenyls (PCB)., *Abstracts of the ASM Annu. Meet.*, 203.
- Frolund B.; Griebe T.; Nielsen P.H., 1995., Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43., 775-761.
- Fulthorpe R.R.; Wyndham R.C., 1992., Involvement of a chlorobenzoate-catabolic Transposon, *Tn5271* in community adaptation to chlorobiphenyl, chloroaniline and 2,4-dichlorophenoxy acetic in a Water ecosystem., *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:314-325.
- Furukawa K., Tomizuka N.; Kamibayashi A., 1980., Bacterial degradation of commercial PCB mixtures (Kaneclors) and their metabolites., *J. Pharm. Dyn.*, 3:S-4.
- Furukawa K.; Chakrabarty A.M., 1982., Involvement of plasmids in total degradation of chlorinated biphenyls., *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:619.
- Furukawa K.; Matsumura F.; Tonomura K., 1978., *Alcaligenes* and *Acinetobacter* strains capable of degrading polychlorinated biphenyls., *Agric. Biol. Chem.*, 42:543-548.
- Furukawa K.; Matsumura F., 1976., Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated biphenyl components by *Alkaligenes sp.*., *J. Agric. Food Chem.*, 24:251.
- Furukawa K.; Tomizuka N.; Kamibayashi A., 1978., Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls., *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:223.

- Furukawa K.; Tomizuka N.; Kamibayashi A., 1979., Metabolism of 2,4,4'-trichlorobiphenyl by *Acinetobacter* sp., *Agric. Biol. Chem.*, 43:1577.
- Furukawa K.; Tomizuka N.; Kamibayashi A., 1979., Effects of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls., *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:301-310.
- Gaal A.; Neujahr H.Y., 1979., Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum.*, *J. Bacteriol.*, (137):13-21.
- Gagnon M.M.; Dodson J.J. Comba M.E.; Kaiser K.L.E., 1990., Congenere-specific analysis of the accumulation of polychlorinated biphenyls (PCB) by aquatic organisms in the maximum turbidity zone of the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada., *Sci. Total Environ.*, 97:739-759.
- Gantzer C.J.; Wackett L.P., 1991., Reductive dechlorination catalyzed by bacterial transition-metal coenzymes., *Environ. Sci. Technol.*, 25:715-722.
- Gardner A.M.; Chem J.T.; Roach J.A.; Ragelis E.P., 1973., Polychlorinated biphenyls. hydroxylated urinary metabolites of 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl identified in rabbits., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55(4):1377-1384.
- Gibson D.T.; Cardini G.E., Maseles F.C., Kallis R.E., 1970., Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida.*, *Biochemistry.*, 9: 1631.
- Gibson D.T.; Koch J.R.; Schuld C.L.; Kallio R.E., 1968., Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. II. Metabolism of the halogenated aromatic hydrocarbons., *Biochemistry.*, 7:3795-3802.
- Gibson D.T.; Roberts R.L.; Wells M.C. and Koval V.M., 1973., Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* species., *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, 50:211-219.
- GiGeronimo M.J.; Nikaido M.; Alexander M., 1979., Utilization of chlorobenzoates by microbial populations in sewage., *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:619.
- Goerke H.; Weber K., 1990., Population-dependent elimination of various polychlorinated biphenyls in *Nereis diversicolor* (Plycaeta), *Mar. Environ. Res.*, 29:205-526.
- Grant D.L.; Phillips W.E. J.; Villeneuve D.C., 1971., Effects of PCB administration on microsomal enzyme activity in pregnant rabbits., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6(29):120-128.
- Grbic-Galic D.; Vogel T.M., 1987., Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures., *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:254-260.
- Green S., Carr J.V.; Palmer K.A.; Oswald E.J., 1975., Lack of cytogenic effects in bone marrow and spermatogonial cells in rats treated with polychlorinated biphenyls (Aroclors 1242 and 1254), *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, 13:14-22.
- Greer D.E.; Keil J.E.; Stillway L.W.; Sandifer S.H., 1974., The effect of DDT and PCB on lipid metabolism in *E. Coli* and *B. fragilis.*, *Bull. Environ. Contam. toxicol.*, 12:295.
- Gregor J.D.; Gummer D.W., 1989., Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian arctic snow., *Environ. Sci. Technol.*, 23:561-565.
- Hagblom M.M., 1992., Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds., *FEMS. Microbiol. Rev.*, 103:29-72.
- Haines T.A., 1983., Organochlorine residues in brook trout from remote lakes in the Northeastern United States., *Water, Air Soil Pollut.*, 20:47-54.
- Hallas L.E.; Alexander M., 1983., Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent., *Appl.*

Environ. Microbiol., (45):1239-1241.

Hambree M.D.; Smyrl R.N.; Davis E.W.; Williams M.D., 1993., Isomeric characterization of polychlorinated biphenyls using gas chromatography-Fourier Transformation on infrared/gas chromatography-mass spectrometry., *Analist*, 118(3):249-251.

Hankin L.; Sawhney B.L., 1984., Microbial degradation of PCB in soil., *Soil Sci.*, 137:401.

Hansen L.G. Washko P.W. Thuinstra L.G.M.TH. Dorn S.B. and Hinesly T.D., 1981., Polychlorinated biphenyls, pesticide, and heavy metal residues in swine foraging on sludge amended soils., *J. Agric. Food Chem.*, 29:1012.

Harada M., 1976., Intrauterine poisoning clinical and epidemiological studies and significance of problem., Kumamoto Univ., *Bull. Inst. Const. Med.*, 25:1-69.

Hartman J.; Reineke W.; Knackmus H.J., 1979., Metabolism of 3-chloro-, 4-chloro-, and 3,5-dichlorobenzoate by a pseudomonad., *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:321.

Harvey G.R. Steinhauer W.G.; Teal J.M., 1973., Polychlorobiphenyls in North Atlantic Ocean water., *Science*, 180:643-644.

Harvey G.R.; Steinhauer W.G., 1976., Transport pathways of polychlorinated biphenyls in Atlantic water., *J. Marine Res.*, 34:561-575.

Hasan M.N.; Jurs P.C., 1990., Prediction of gas and liquid chromatographic retention indices of polychlorinated biphenyls., *Anal. Chem.* 62(21):2318-2323.

Havel J.; Reineke K., 1991., Total degradation of various chlorobiphenyls by cocultures and in vitro constructed hybrid pseudomonads., *FEMS-Microbiol. Lett.*, 78(2-3):163-170.

Hawker D.W., 1989., Vapour pressures and Henry's Law Constant of polychlorinated biphenyls., *Environ. Sci. Technol.*, 23:1250-1253.

Hawthorne B.S.; Krieg S.M.; Miller J.D. 1989., Supercritical carbon dioxide extraction of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, heteroatom-containing polycyclic aromatic hydrocarbons, and n-alkalenes from polyurethane foam sorbents., *Anal. Chem.*, 61:736-740.

Hayase N.; Taira k.; Furukawa K., 1990., *Pseudomonas putida* KF175 bphABCD operon encoding biphenyls and polychlorinated biphenyls degradation., *Journal of bacteriology*, 172(2):1160-1164.

Herbst E.; Scheunert I.; Klein W.; Korte F., 1977., Fate of PCBs-¹⁴C in sewage treatment - laboratory experiments with activated sludge., *Chemosphere*, 6:725-730.

Hernández B.S.; Higson F.K.; Focht D.D., 1990., Metabolisms and inhibition of dichlorobenzoic acid., *Abstr. Annu.Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 90 meet. 220.

Higson K.F., 1992a., Microbial degradation of biphenyl and its derivatives., *Advances in Applied Microbiology*, (37):135-164.

Higson K.F., 1992b., Microbial degradation of nitroaromatic compounds., *Adv. Appl. Microbiol.*, (37):1-19.

Hillebrand M.T.H.J.; Everarts J.M.; Razak H.; Moelyadi D.; Stolwijk L.; Boon J.P., 1989., Input of selected chlorinated hydrocarbons into the coastal area of East Java and adjacent waters; distribution patterns in the dissolved and suspended phase., *Neth. J. Sea. Res.*, 23:369.

Holden A.V.; Marsden K., 1969., Single-stage clean-up of animal tissue extracts for organochlorine residue analysis., *J. of Chromatography*, 44:481-492.

- Holmes D.C.; Simmons J.H.; Tatton J.O'G., 1967., Chlorinated hydrocarbons in British wildlife., *Nature (London)*, 216:227.
- Holt L.R.; Cruse S.; Greer S.E., 1986., Pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human adipose tissue from northeast Louisiana., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36:651-655.
- Holzappel-Pschorn A.; Obst U.; Haberer K., 1988., Einstz enzymatischer untersuchungen in der wasseraufbereitung., *Fresenius Zetschrift fur Analytische Chemie.*, 330., 439-440.
- Hong C.S.; Bush B., 1990., Determination of mono-orto coplanar PCBs in fish., *Chemosphere.*, 21:173.
- Hoopingarner R.A.; Samuel A.; Krause D., 1972., Polychlorinated biphenyls interactions with tissue culture cells., *Envir. Health Persp.*, 1:155-158.
- Horowitz A.; Shelton D.R.; Cornell C.P.; Tiedje J.M., 1982., Anaerobic degradation of aromatic compounds in sediments and digested sludge., *Dev. Ind. Microbiol.*, 23:433-444.
- Horvath R.S., 1972., Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature., *Bacteriol. Rev.*, 36:146.
- Horvath R.S.; Alexander M., 1970., Cometabolims of *m*-clorobenzoato by an *Arthrobacter sp.*, *Appl. Microbiol.*, (20):254-258.
- Horvarth R.S., 1971., Co-metabolism of the herbicide 2,3,6-trichlorobenzoate., *J. Agric. Food. Chem.*, 19:291.
- Huckins N.J. Swanson E.J. Stalling L.D., 1988., Technical comunication: Perchlorination of polychlorinated biphenyls., *Journal of the AOAC.*, 57(2):416-421.
- Hutzinger O.; Safe S.; Zitko V., 1974., The chemistry of PCB's., *CRC Press: Cleveland, Ohio*, pp.269.
- Ichihara A.; Adachi K.; Hosokawa K.; Takeda Y., 1962., The enzymatic hydroxilation of aromatic carboxylic acids; substrate specificities of antraniline and benzoate oxidase., *J. Biol. Chem.*, (237):2296-2302.
- Ioto N.; nagasaki H.; Makiura S. and Arai M., 1974., Histopatological studies on liver tumorigenesis in rats treated with polychlorinated biphenyls., *Gann.*, 65:545-547.
- Iwata Y.; Gunther F.A., 1976., Translocation of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 from soil into carrots under field conditions., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 4:44.
- Iwata Y.; Westlake W.E.; Gunther F.A., 1973., Varing persistence of polychlorinated biphenyl in six California Soils under laboratory conditions., *Bull, Environ. Contam. Toxicol.*, 9:204.
- Jacobson S.M.; Alexander M., 1981., Enhancement of the microbial dehalogenation of a model chlorinated compounds., *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:1062-1066.
- Jacobson S.W.; Jacobson J.L.; Schwartz P.M. and Fein G.C., 1983., Intrauterine exposure of human newborns to PCBs: measures of exposure, In: PCBs: human and environmental hazards., *F.M. Ditri and M.A. Kamrin (eds)*, *Butterworth Press.*, 311-344.
- Jakus V., 1991a., Evaluation of adsortion and retention models for separation of polychlorinated biphenyls by HPLC on reversed phases., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 56(12). 2849-2858.
- Jakus V.; Miertus S., 1991b., Theoretical interpretation of retention data of polychlorinated biphenyls in liquid chromatography., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 56(12):2833-2848.

- Janke D.; Baskunov P.; Nefedova M.Y.; Zyankun A.M.; Golovleva L.A., 1984., Incorporation of $^{18}\text{O}_2$ during cometabolic degradation of 3-chloroaniline by *Rhodococcus* An 117., *Z.All. Mikrobiol.*, 24:253-259.
- Janke D.O.V; Maltseva L.A.; Glovleva L.A.; Fritsche., 1984., On the relation between cometabolic monochloroaniline turnover and intermediary metabolism in *Rhodococcus* An.117., *Z. All.Mikrobiol.*, 24: 305-316.
- Jenik J.; Vojteková A.; Kopanica M.; Stará V., 1986., Determination of pollutants in waters. VI. new methods for determination of polychlorinated biphenyls., *Sci. Pap. Inst. Chem. Technol. Pardubice.*, 49:195-211.
- Jensen S.; Sundström G., 1974., Structure and levels of most chlorobiphenyls in two technical PCB products and in human adipose tissue., *Ambio.*, 3:70-76.
- Jensen S.; Jansson B., 1976., Methylsulfone metabolites of PCB and DDE in seals from the Baltic., *Ambio.*, 5:257-260.
- Jiménez B.; Tabera J.; Hernández M.; González J., 1992., Simplex optimization of the analysis of polychlorinated biphenyls by HPLC on reversed phases., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 56(12):2849-2858.
- Johnston H.W.; Briggs G.G.; Alexander M., 1972., Metabolism of 3-chlorobenzoic acid by a pseudomonad., *Soil. Bio. Biochem.*, 4:187-190.
- Jondorf W.R. and Wyss P.A., 1983., Deposition of 2,2',4,4',5,5'hexachlorobiphenyl (6-CB) in rats with decreasing adipose tissue mass II: Effects of restricting food intake before and after 6-CB administration., *Drug. Metab. Disp.*, 11:597-601.
- Kaiser K.L.E., 1974., On the optical activity of polychlorinated biphenyls. *Environ. Pollut.*, 7:93-101.
- Kaiser K.L.E.; Wong P.T.S., 1974., Bacterial degradation of polychlorinated biphenyls. I. Identification of some metabolic products from Aroclor 1242., *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 11:291.
- Kaminski U., Janke D.; Prauser H., Fritsche W., 1983., Degradation of aniline and monochloroaniline by *Rhodococcus* sp .N. 117 and a pseudomonad: A comparative study. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 23:235-246.
- Kaminsky L.S.; Kennedy M.W.; Adams S.M.; Guengerich F.P., 1982., Metabolism of dichloro biphenyls highly purified isoenzymes of rat liver cytochrome., *Biochemistry.*, 20(26): 7379-7384.
- Kamlet M.L.; Doherty R.M.; Carr P.W.; Mackay D.; Abraham M.H.; Taft R.W., 1988., Parameter estimation rules that allow accurate prediction of octanol/water partition coefficients and other solubility and toxicity properties of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons., *Environ. Sci. Technol.*, 22(5):503-509.
- Kaneko M.; Morimoto K.; Nambu S., 1976., The response of activated sludge to a polychlorinated biphenyl (KC-500), *Water Res.*, 10:157-163.
- Kannan N.; Tanabe R.; Tatsukawa., 1988., Toxic potential of non-ortho and mono-ortho coplanar PCBs in commercial PCB preparations: 2,3,7,8-T4 CDD Toxic equivalence factors approach., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41:267-276.
- Karasek F.W.; Clement R.E.; Sweetman J.A., 1981., Preconcentration for trace analysis of organic compounds., *Anal. Chem.*, 53(9):1050-1058.
- Kato S.; McKinney J.D.; Matthews H.B., 1980., Metabolism of symmetrical hexachloro biphenyl isomers in the rat., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53(3):389-398.
- Kaufman D.D.; Plimmer J.R.; Klingebiel U.I., 1973., 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene from 3,4-dichloro-aniline in microbial culture., *J. Agric. Food Chem.*, 20:916-919.

- Kearney P.C.; Plimmer J.R., 1972., Metabolism of 3,4-dichloroaniline in soils., *J. Agric. Food. Chem.*, 20:584-585.
- Keil J.E.; Graber C.D.; Priester L.E.; Sandifer S.H., 1972., Polychlorinated biphenyls (Aroclor 1242): effects of uptake on *E. Coli* growth., *Environ. Health Perspect.*, 1:175.
- Keitel G., 1982., The effects of solutes in bubble size in air-water dispersion., *Chem. Eng. Sci.*, 17:85.
- Keith I.H., 1990., Environmental sampling: A brief summary., *Environ. Sci. Technol.*, 24:610.
- Kennedy M.W.; Carpenter N.K.; Dymerski P.P.; Kaminsky L.S., 1981., Metabolism of dichloro biphenyls by hepatic microsomal cytochrome P.450., *Biochem. Pharmacol.*, 30(6):577-588.
- Kennedy N.W.; Carpenter N.K., Demerski P.P.; Adams S.M.; Kaminsky L.S., 1980., Metabolism of monochloro biphenyls by hepatic microsomal cytochrome P-450., *Biochem. Pharmacol.*, 29(5):727-736.
- Knackmus H.J.; Reineke W., 1973., Der Einfluss von Chlorsubstituenten auf die oxygenierung von Benzoat durch *Alcaligenes eutrophus* B9., *Chemosphere.*, 2:225.
- Koeman J.H.; Ten Noever D.; Brauw MC.; De Vos R.H., 1993., Chlorinated biphenyls in fish, mussels and birds from the River Rhine and the Netherland coastal area., *Nature (London)*, 221:1126.
- Kock A.; Geerdink R.B.; Frei R.W.; Brinkman U.A., 1981., The use of dechlorination in the analysis of polychlorinated biphenyls and related classes of compounds., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 9:301-318.
- Kominar R.J.; Onuska F.I.; Terry K.A., 1985., Packed columns vs. wall-coated open-tubular columns in quantitative analyses of polychlorinated biphenyls., *J. High resolut. Chromatogr. Commun.*, 8:585-590.
- Kong H. L; Sayler S G., 1983., Degradation and total mineralization of monohalogenated biphenyls in natural sediment and mixed bacterial culture., *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(3):666-672.
- Kuhn E.P.; Colberg P.J. Schnoor J.L.; Wanner O.; Zehnder A.J.B.; Schwartzenbach R.P., 1985., Microbial transformation of substituted benzenes during infiltration of river water to ground water: Laboratory column studies., *Environ. Sci. Technol.*, 19:961-967.
- Kutz, F. 1976., The rising clamor about PCB's., *Environmental Science & Technology*, 10(2):122-123.
- La Mota E.J., 1976., Internal diffusion and reaction in biological films., *Environ. Sci. Technol.*, 10(8):765-769.
- Laha S.; Luthy G. R., 1992., Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of Phenanthrene in soil-water systems., *Biotechnology and Bioengineering*, vol.40., pp. 1367-1380.
- Lang Vit., 1992., Polychlorinated Biphenyls in the environment. Review., *Journal of Chromatography*, 595:1-43.
- Larsson P.; Okla L.; Ryding S.O.; Westö., 1990., Contaminated sediment as a source of PCB in a river system., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47:746.
- Lassiter R.R.; Baughman G.L.; Burns L.A., 1979., Fate of toxic substances in the environment, In: State of the art in ecological modelling., *Inter. Soc. Ecol. Model.* (7):219-246.
- Lawrence J.; Tosine M. H. 1976., Adsorption of polychlorinated biphenyls from aqueous solution and sewage., *Environmental Science & Technology*, 10(4):381-383.
- LeBel G.L.; Williams D.T., 1986., Determination of halogenated contaminants y human adipose tissue., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69:458-458.

- Leoni V., Puccetti G.; Colombo R.J.; Dnovidio A.M., 1976., The use of Tenax for the extraction of pesticides and polychlorinated biphenyls from water II. Test with artificially polluted and natural waters., *Journal of chromatography*, 125:399-407.
- Liu D., 1980., Enhancement of PCBs biodegradability by sodium ligninsulfonate., *Water Res.*, 14:1467.
- Liu D., 1982., Assessment of continuous biodegradation of commercial PCB formulations., *Bul. Environ. Contam. Toxicol.*, 29:200.
- Livingston G.A., 1993., A novel membrane bioreactor for detoxifying industrial wastewater: II. Biodegradation of 3-chloronitrobenzene in an industrially produced wastewater., *Biotechnology and Bioengineering*, 41, Pp. 927-936.
- Livingston G.A., 1996., A novel Membrane bioreactor for detoxifying industrial wastewaters I: biodegradation of phenol in a synthetically concocted wastewater., *Biotechnol. and Bioengineering*, 41., pp.915-926.
- Livingstone G.A. 1995., Removal and destruction of priority pollutants from chemical industry wastewaters using an innovative membrane bioreactor., *Ihceme symposium series No. 132.*, Pp.131-146.
- Loganathan B.G.; Tanabe S.; Goto M.; Tatsukawa R., 1989., Temporal trends of organochlorine residues in lizard goby *Rhinogobius flumineus* from the river Nagaragawa, Japan., *Environ. Pollut.*, 62:237.
- Luke B.G.; Johnstone G.W.; Woehler E.J., 1989., Organochlorine pesticides, PCBs and mercury in antarctic and subantarctic seabirds., *Chemosphere.*, 19:2007.
- Lunt D.; Evans W.C., 1970., The microbial metabolism of biphenyl., *Biochem. J.*, 118:54-55P.
- Maack L.; Sonzogni W.C., 1988., Analysis of polychloro biphenyl congeners in Wisconsin fish., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 17:711-719.
- Maguire M.J.; Tkacz J.R., 1989., Potential understimation of chlorinated hydrocarbon concentrations in fresh water., *Chemosphere.*, 19:1277.
- Marinucci A.C., Bartha R., 1979., Biodegradation of 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene in soil and in liquid enrichment culture., *Appl. Environ. Mikrobiol.*, 38:811-817.
- Martin D.B.; Hartman A.W., 1985., Organochlorine pesticides and polychlorinated-biphenyls in sediments and fish from wetlands in the North Central United-States., *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68:712-717.
- Masse R.; Badr M.; Ayotte C.; Sylvestre M., 1985., Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of bacterial metabolites of 4-nitrobiphenyl formed in gram-negative strain B-206., *Toxicol. Environ. Chem.*, (19):225-246.
- Matthews H.B. Anderson M.W., 1975., Effects of chlorination on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyls., *Drug Metab. Dispos.* 3/5:371-380.
- Mauck W.L.; Olson L.E., 1977., Polychlorinated biphenyls in adults mayflies (*Hexagenia bilineata*) from the upper Mississippi River., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17:387-390.
- Mavoungou R.; Massé r.; Sylvestre M., 1991., Microbial dehalogenation of 4,4'-dichlorobiphenyl under anaerobic conditions., *Sci. Total Environ.*, 101:263-268.
- May H.D.; Boyle A.W.; Price W.A.; Blake C.K., 1992., Subculturing of a polychlorinated biphenyls-dechlorinating anaerobic enrichment on soil media., *Appl. Environ. Microbiol.* 58:4051-4054.
- Mermelstein R.; Kiriazides D.K.; Butler M.; McCoy E.C.; Rosenkranz H.S., 1981., The extraordinary mutagenicity of nitropyrenes in bacteria., *Mutat. Res.*, 889:1887-196.

- Mes J. Marchand L.; Davies D.J., 1990., Specific polychlorinated biphenyls congeners distribution in adipose tissue of Canadians., *Environ. Technol.*, 11:747-756.
- Mes J.; Arnold D.L.; Bryce F.; Davies D.J.; Karpinski K., 1989., The effect of long-term feeding of Aroclor 1254 to female Rhesus monkeys on their polychlorinated biphenyl tissue levels., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18:858-865.
- Mes J.; Marchand L., 1987., Comparison of some specific polychlorinated biphenyls isomers in human and monkey milk., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39:736-742.
- Mes J.; Marchand L.; Karpinski K., 1989., Polychlorinated biphenyl isomers in the blood and biopsy fat specimens of selected population of British Columbia (Canada), *J. Environ. Sci. Health.*, A24:879-896.
- Metcalf R.L.; Sanborn J.R.; Lu P.Y.; Nye D., 1975., Laboratory model ecosystem studies of the degradation and fate of radiolabeled tri-, tetra- and pentachlorophenyls compared with DDE., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 3:151.
- Mohn W.W.; Tiedje J.M., 1992., Microbial reductive dehalogenation., *Microbiol. Rev.*, 56:482-597.
- Mondello F.J., 1989., Cloning and expression in *Escherichia coli* of Pseudomonads strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyls degradation., *J. Bacteriol.*, 171:1725-1732.
- Moore F.W., 1969., The utilization of pyridine by microorganisms., *J. Gen. Microbiol.*, (3):143-147.
- Morris P.J.; Mohn W.W.; Quensen J.F.; Tiedje J.M.; Boyd S.A., 1992a., Establishment of a polychlorinated biphenyls-degrading enrichment culture with predominantly meta dechlorination., *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:3088-3094.
- Morris P.J.; Quensen J.F.; Tiedje J.M.; Boyd S.A., 1992b., Reductive debromination of the commercial polychlorinated biphenyl mixture firemaster BP6 by anaerobic microorganisms from sediments., *Appl. Environ. Microbiol.*, (8):3249-3256.
- Morrison P.J.; Quensen J.F.; Tiedje J.M.; Boyd S.A., 1993., An assessment of the reductive debromination of polychlorinated biphenyls in the Pine River reservoir., *Environ. Sci. Technol.*, 27:1580-1586.
- Morse R.A.; Culliney T.W.; Gutenmann W.H.; Littman C.B.; Lisk D.J., 1987., Polychlorinated biphenyls in honey bees., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 38:271-276.
- Morselli L.; Zappoli S.; Donati S., 1989., Identification, quantification and distribution of polychlorinated biphenyls (PCB) in an Antarctic marine environment: Terra Nova Bay, Ross Sea., *Ann. Chim.*, 79:677-688.
- Mulher B.M.; Cromartie E.; Reichel W.L.; Belisle A.A., 1971., Semiquantitative determination of polychlorinated biphenyls in tissue samples by thin layer chromatography., *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 54:548-550.
- Mullin D.M.; Pochini C.M., 1981., High-Resolution PCB analysis: synthesis and chromatographic properties of all 209 PCB congeners., *Environ. Sci. Technol.*, 18:466-476.
- Murado M.A.; Tejedor M.C.; Baluja G., 1976., Interactions between polychlorinated biphenyls (PCBs) and soil microfungi. Effect of Aroclor 1254 and other PCBs on *Aspergillus flavus* cultures., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 15:768.
- Nakanishi T.; Oku h., 1969., Metabolism and accumulation of pentachloronitrobenzene by phytopathogenic fungi in relation to selective toxicity., *Phytopathology* 59:1761-1762.
- Nakano T.; Tsuji M.; Okuno T., 1990., Distribution of PCDDs, PCDFs and PCBs in the atmosphere., *Atmos Environ.* 24A:1361.

- Nakatsu C.; Eng J.; Singh R.; Straus N.; Wyndham C., 1991., Chlorobenzoate catabolic Transposon Tn5271 is a composite class 1 element with flanking class 2 insertion sequences., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:8312-8316.
- Nawas M.S. Chapatwala K.D., 1991., Simultaneous degradation of acetonitrile and biphenyls by *Pseudomonas aeruginosa*., *Canadian J. Microbiol.*, 56(9):2612-2617.
- Nebert D.W.; Gilboin H.V., 1968., Substrate-inducible microsomal Aryl hydroxylase in mammalian cell culture. II. Cellular responses during enzyme induction., *J. Biol. Chem.*, 243:6242.
- Needham L., Burse V.W.; Price H.A., 1981., Temperature-programmed gas-chromatographic determination of polychlorinated and polybrominated biphenyls in serum., *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 64:1131-1137.
- Newsome W.H.; Shields J.B., 1981., Radio-immunoassay of PCB (polychlorinated biphenyls) in milk and blood., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 10:295-304.
- Nies L.; Vogel M. T., 1990., Effects of organic substrates on dechlorination of Aroclor 1242 in Anaerobic Sediments., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(9):2612-2617.
- Nilsson B.; Ramel C., 1974., Genetic test on *Drosophila melanogaster* with polychlorinated biphenyls (PCBs), *Hereditas*, 77:319-322.
- Nisbet I.C.; Sarofin A.F., 1972., Rates and routes of transport of PCBs in the environment., *Environ. Health Persp.*, 1:21-38.
- Nissen T.V., 1973., Stability of PCB in the soil., *Tidskr. Planteavl.*, 77:533.
- Noren K.; Westoo G., 1978., Determination of some chlorinated pesticides in vegetable oils, margarine, butter, milk, eggs, meat and fish by gas chromatography and thin-layer chromatography., *Acta Chem. Scand.*, 22:2289-2293.
- Norstrom R.J.; Simon M.; Muir D.C.G.; Schweinsburg R.E., 1988., Organochlorine contaminants in arctic marine food chains: Identification, geographical distribution and temporal trends in polar bears., *Environ. Sci. Technol.*, 22:1063-1071.
- Nose K., 1972., Decachlorination of polychlorinated biphenyls and its application to soil and rice analysis., *L. Agr. Chem. (Japan)*, (46):679.
- Nybroe O.L.; Jorgensen P.E. Henze M., 1992., Enzyme activities in wastewater and activated sludge., *Water Research*, 26/5 579-584.
- Ohmori T.; Ikai T.; Minoda Y.; Yada K., 1973., Utilization of polyphenyl and polyphenyl-related compounds by microorganisms, part I., *Agric. Biol. Chem.*, (37):1599-1605.
- Olafsson P.G.; Bryan A.M., 1987., Toxic congenere-specific analysis of PCB-assessment of toxicity in equivalents of TCDD., *Anal. Lett.*, 20:1719-1727.
- Onuska F.I.; Komisar R.J.; Terry K.A., 1983., Identification and determination of polychlorinated biphenyls by high-resolution gas chromatography., *J. Chromatogr.*, 279:111-118.
- Oppenhuizen A. Gobas F.A.P.C; and Van Der Steen J.M.D., 1988., Aqueous solubility of polychlorinated biphenyls related to molecular structure., *Environ. Sci. Technol.*, 22:638-646.
- Oppenhuizen A.; Voors P.I., 1987., Bioconcentration kinetic of 2,4,5-tri and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyls and 2,3,5-tri and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyls ether in fish., *Chemosphere*, 16:2379-2388.

- Palt D.; Weber J.B.; Tosine H.M., 1980., Fate of polychlorinated biphenyls (PCBs) in soil plants systems., *Residue Rev.*, 74:45.
- Pellantová J.; Hudec K.; Kredl F.; Svobodnik J.; Svobodová R., 1989., Organochlorine pesticides PCB and heavy metals residues in eggs of the black-headed gull *Larus ridibundus* in Czechoslovakia., *Folia Zool.*, 38:79-86.
- Petrick G.; Schulz D.E.; Diunker J.C., 1988., Clean-up environment samples by gas chromatography with electron-capture detection., *J. Chromatogr.*, 435:241-248.
- Porter M.L.; Young S.L.V.; Burke J.A., 1970., A method for the analysis of fish, poultry and tissue for chlorinated pesticide residues., *J. Assoc. of Anal. Chem.*, 53:1300-1303.
- Preston B.D.; Miller J.A.; Miller E.C., 1983., Non-arene oxide aromatic ring hydroxylation of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl as the major metabolic pathway catalyzed by phenobarbital-induced rat liver microsomes., *J. Biol. Chem.*, 258(13):8304-8311.
- Preston B.D.; Van Miller J.P.; Moore R.W.; Allen J.R., 1981., Promoting effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) and polychlorinated dibenzofuran-free Aroclor 1254 on diethylnitrosamine-induced tumorigenesis in the rat., *J. National Cancer Inst.*, 66:509-515.
- Quee Hee S.S.; Ward J.A.; Tabor M.W.; Suskind R.R., 1983., Screening methods for Aroclor 1254 in the whole blood., *Anal. Chem.*, 55:157.
- Quensen F.J.; Tiedje M.J.; Boyd A.S., 1989., Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls mixtures (Aroclor) by anaerobic microorganisms from sediments., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(8):2360-2369.
- Quensen J.F.; Boyd S.A.; Tiedje J.M., 1990., Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyls mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments., *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:2360-2369.
- Quensen J.F.; Tiedje J.M.; Boyd S.A., 1988., Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls by anaerobic microorganisms from sediments., *Science*, 242:752-754.
- Reber H.; Helm V.; Karanth N.G.K., 1979., Comparative studies of anilines and chloroanilines by *Pseudomonas multivorans* strain An1.Eur., *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87:181-189.
- Reiber, S.; Stensel H.D., 1985., Biological enhanced oxygen transfer in a fixed-film system., *Journal WPCF.*, 57(2):135-142.
- Reineke W., 1988., Microbial degradation of haloaromatics., *Ann. Rev. Microbiol.*, (42):263-287.
- Reineke W., Knackmuss H.J., 1984., Microbial metabolism of haloaromatics: isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium., *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:395-402.
- Reineke W.; Knackmuss H.J., 1978., Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of benzoic acid., *Biochim. Biophys. Acta.*, (542):412-423.
- Reineke W.; Knackmuss H.J., 1979., Construction of haloaromatics utilizing bacteria., *Nature*, 277:285-286.
- Reineke W.; Knackmuss H.J., 1980., Hybrid pathways for chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas* sp. B13 derivatives., *J. Bacteriol.*, 142:467-473.
- Reiner A.M.; Hegeman G.D., 1971., Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*., *Biochemistry*, 10:2530.
- Reznicek J., 1987., Rapid determination of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the blood., *Prac. Lek.*, 39:185-189.

- Rhee G.Y., Sokol R.C., Bethoney C.M.; Bush B., 1993c., A long-term study of anaerobic dechlorination of PCB congeners by sediments microorganisms: Pathways and mass balance., *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:1829-1834.
- Rhee G.Y.; Bush B.; Bethoney C.M.; DeNucci A.; Oh H.M. Sokol R.C., 1993b., Reductive dechlorination of Aroclor 1242 in anaerobic sediments: Pattern, rate and concentration dependence., *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:1025-1032.
- Rhee G.Y.; Bush B.; Bethoney C.M.; DeNucci A.; Oh H.M., Sokol R.C., 1993a., Anaerobic dechlorination of Aroclor 1242 as affected by some environmental conditions., *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:1033-1039.
- Rhee Y.G.; Brown P.M.; Kane M.; Shane Y., 1989., Anaerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in Hudson River sediments and dredge sediments in clay encapsulation., *Wat. Res.*, 23(8):957-964.
- Risinger S., Klages U.; Lingens F., 1976., Abbau der 4-chlorobenzoensäure durch eine *Arthrobacter*-species., *Arch. Microbiol.*, 110:253-256.
- Robbat A.; Liu T.; Abraham M.B., 1992., Evaluation of a thermal desorption gas chromatograph-mass spectrometer: on-site detection of polychlorinated biphenyls at a hazardous waste site., *Analytical Chemistry*, 64(4):358-364.
- Robbat A.; Xyrafas G.; Marshall D., 1988., Prediction of gas chromatographic retention characteristic of polychlorinated biphenyls., *Anal. Chem.*, 60(10):982-985.
- Robinson C.W., 1974., Simultaneous measurements of interfacial area and mass transfer coefficients for a well-mixed gas dispersion in aqueous electrolyte solutions., *An. Inst. Chem. Eng. J.*, 20:25.
- Roth J.A.; Dakoji S.R.; Hughes R.C.; Carmody R.E., 1994., Hydrogenolysis of polychlorinated biphenyls by sodium borohydride with homogeneous and heterogeneous nickel catalysts., *Environ. Sci. Technol.*, 28:80-87.
- Ruisinger S.; Klages U.; Lingens F., 1976., Abbau der 4-Chlorobenzoensäure durch eine *Arthrobacter* Species., *Arch. Microbiology*, 110:253.
- Sahney B.; Hankin I., 1984., Plant contamination by PCBs from amended soil., *J. Food Protect.*, 47:232.
- Sawyer L.D. 1978., Quantitation of polychlorinated biphenyls residues by electron capture gas-liquid chromatography-reference material characterization and preliminary study., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61:272.
- Sayler G.S.; Breen A.; Blackburn J.W.; Yagi O., 1984., Predictive assessment of priority pollutant bio-oxidation kinetics in activated sludge., *Environ. Prog.*, 3:153-163.
- Sayler G.S.; Shon M.; Colwell R.R., 1977., Growth of an estuarine *Pseudomonas* sp. on polychlorinated biphenyl., *Microbiol. Ecol.*, 3:241
- Sayler G.S.; Thomas R.; Colwell R.R., 1978., Polychlorinated biphenyl (PCB) degrading bacteria and PCB in estuarine and marine environment., *Estuarine Coastal Mar. Sci.*, 6:553.
- Schechter A.; Mes J.; Davies D., 1989., Polychlorinated biphenyls (PCB), DDT, DDE and hexachlorobenzene (HCB) and PCDD/F isomer levels in various organs in autopsy tissue from North American patients., *Chemosphere*, 18:811-818.
- Schmidt E.; Remberg G.; Knackmuss H.J., 1980., Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Halogenated muconic acids as intermediates., *Biochem. J.*, (192):331-337.
- Schneider J.F.; Reddy G.T.; Wttinger D.G., 1985., GC matrix-isolation FTIR applications analysis of PCBs., *J. Chromatogr. Sci.*, 23:49.

- Schnellmann R.G.; Volp R.F.; Putnam C.W.; Sipes I.G., 1984., The hydroxylation dechlorination and glucuronidation of 4,4'-dichlorobiphenyl by human hepatic microsomes., *Biochem Pharmacol.*, 33(21):3503-3510.
- Schoeny R.S. Smith C.C.; Loper J.C., 1979., Non-mutagenicity for *Salmonella* of chlorinated hydrocarbons Aroclor 1254, 1,2,4-trichlorobenzene, Mirex and Kepone., *Mutagen. Res.*, 68:125-132.
- Schulz D.E.; Petrick G.; Diunker J.C., 1988., Chlorinated biphenyls in North Atlantic Surface and Deep Water., *Mar. Pollut. Bull.*, 19:526.
- Schwartz R.D.; Williams A.L.; Hutchinson D.B., 1980., Microbial production of 4,4'-dihydroxybiphenyl: biphenyl hydroxylation by fungi., *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:702.
- Sericano J.L.; Atlas E.L.; Wade T.L.; Brooks J.M., 1990., NOAA's status trends mussel watch program: chlorinated pesticides and PCBs in oysters (*Crassostrea virginica*) and sediments from the Gulf of Mexico., *Mar. Environ. Res.*, 29:161-203.
- Seymour M.P.; Ahlging B.; Jensen S., 1970., Reverse liquid-liquid partition in determination of polychlorinated biphenyls (PCB) and chlorinated pesticides in water., *Anal. Chem.*, 42(13):1483-1486.
- Seymour M.P.; Duncan I.W.; Jefferies T.M.; Notarianni L.J., 1986a., Clean-up and separation of chlorobiphenyl isomers after synthesis by Cadogan coupling using preparative high-performance liquid chromatography., *J. Chromatogr.*, 368:174-179.
- Seymour M.P.; Jefferies T.M.; Floyd A.J.; Notarianni L.J., 1987., Routine determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk using capillary gas chromatography-mass spectrometry., *Analyst.*, 112:427-331.
- Seymour M.P.; Jefferies T.M.; Notarianni L.J., 1986b., Large-scale separation of lipids from organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls using a polymeric high-performance liquid chromatographic column., *Analyst.*, 111:1203-1205.
- Seymour M.P.; Jefferies T.M.; Notarianni L.J., 1986c., Limitations in the use of nickel boride dechlorination for the analysis of polychlorinated biphenyls., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 37:199-206.
- Shailubhai K.; Sahasrabudhe S.R.; Vora K.A.; Modi V.V., 1984., Degradation of chlorobenzoates by *Aspergillus niger*., *Experientia.*, 40:406-497.
- Shakim M.; Andrillon P.; Goetz N.; Bore P.; Bugaut A.; Kalopissis G., 1979., Studies on the mutagenicity of p-phenylenediamine in *Salmonella typhirium*. Presence of PCBs in rats liver microsomal fraction induced by Aroclor., *Mutation Res.* 68:327-336.
- Shane L.A.; Bush B., 1989., Accumulation of polychlorobiphenyls congeners and P.P-DDE at environmental concentrations by corn and beans., *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, 17:38.
- Shaw G.R.; Connell D.W., 1984., Physicochemical properties controlling polychlorinated biphenyl (PCB) concentration in aquatic organisms., *Environ. Sci. Technol.*, 18:18-23
- Shield M.S.; Hooper S.W.; Saylor G.S., 1985., Plasmid-mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl., *J. Bacteriol.*, (163):882-889.
- Shoda M.; Uda S., 1980., Preferential utilization of phenol rather than glucose by *Tricosporon cutaneum* possessing a partially constitutive catecol 1,2-oxygenase., *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:1129-1133.
- Sipes I.G.; McKelvie D.H.; Collins R., 1979., Excretion of hexachlorobiphenyl and 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl in the dog., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 48:A155

- Sipes I.G.; Slocumb M.L.; Chen H.S.G.; Carter D.E., 1982., 2,3,6,2',3',6'-hexachlorobiphenyl: distribution, metabolism and excretion in the dog and the monkey., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62(2):317-324.
- Sistovaris N.; Donges U.; Dudel B., 1990., Determination of traces of polychlorinated biphenyls in pigments., *J. High. Resolut. Chromatogr.* 13:547.
- Slade P., 1976., IUPAC. Commission on the development, improvement, and standardization of methods of pesticides residue analysis., *Journal of the AOAC.*, 59(4):894-895.
- Slander H.G.; Jerina D.M.; Daly J.W., 1975., Metabolism of the chlorobenzene with hepatic microsomes and solubilized cytochrome P-450 systems., *Arch. Biochem. Biophys.*, 168(1):309-321.
- Slander H.G.; Jerina D.M.; Piccolo D.E.; Berchtold G.A., 1975., Letter: Synthesis of 3- and 4-chlorobenzene oxides. Unexpected trapping results during metabolism of [¹⁴C] chlorobenzene by hepatic microsomes., 1975., *J. Am. Chem. Soc.* 97(15):4428-4430.
- Sleat R. Robinson J.P., 1984., The bacteriology of anaerobic degradation of aromatics compounds, A review., *Appl. Bacteriol.*, 57:381-394.
- Smith L.M.; Schwartz T.R.; Feltz K.; Kubiak T.J., 1990., Determination and occurrence of AHH-active polychlorinated biphenyls, 2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in Lake Michigan sediment and biota. The question of their relative toxicological significance., *Chemosphere.*, 21:173.
- Smith R.V.; Rosazza J.P., 1974., Microbial models of mammalian metabolism., Aromatic hydroxylation., *Arch. Biochem. Biophys.*, 161:551-558.
- Södergren A., 1972., Chlorinated hydrocarbon residues in airborne fallout., *Nature (Lond.)*, 236:395-397.
- Södergren A., 1990., Monitoring of persistent lipophilic pollutants in waters and sediments by solvent filled dialysis membranes., *Ecotoxicol. Environ.*, 19:143.
- Sofer, Z. 1986., Chemistry of hydrogen gas preparation by pyrolysis for the measurement of isotope ratios in hydrocarbons., *Anal. Chem.* 58(9):2029-2032.
- Spain J.C.; Gibson D.T., 1991., Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moxarella sp.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, (57): 812-819.
- Stainer R.Y.; Ornston L.N., 1973., The β -ketoacid pathway., *Adv. Microb. Physiol.*, (9):89-149.
- Stalling D.L.; Norström R.J.; Smith L.M.; Simon M., 1985., Patterns of PCDD, PCDF, and PCB contamination in Great Lakes fish and birds and their characterization by principal components analysis., *Chemosphere.*, 14:637-643.
- Stalling D.L.; Tindle R.C.; Johnson J.L., 1972., Clean-up of pesticides and polychloro biphenyl residues in fish extracts by gel permeation chromatography., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 55:32.
- Strek H.J.; Weber J.B.; Shea P.S.; Mrozek. And Overcash M.R., 1981., Reduction of polychlorinated biphenyls toxicity and uptake of carbon-14 activity by plants through the use of activated carbon., *J. Agric. Food Chem.*, 29:288-293.
- Stürken K.; Peinemann V.K.; Ohlrogge K. And Behling R.D., 1991., Removal of organic pollutants from gaseous and liquid effluent streams by membranes., *Wat. Sci. Tech.*, 24(12):1-9.
- Suflita J.M.; Horowitz A.; Shelton D.R.; Tiedje J.M., 1982., Dehalogenation: a novel pathway for the anaerobic biodegradation of haloaromatic compounds., *Science.*, (218):1115-1117.

- Suflita J.M.; Robinson J.A.; Shelton D.R.; Tiedje J.M., 1983., Kinetics of microbial dehalogenation of haloaromatic substrates in methanogenic environments., *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:1466-1473.
- Sundstrom G.; Slocumb M.L.; Safe S., 1976., The metabolism of chlorobiphenyls: a review., *Chemosphere* 5(5):267-298.
- Surovtseva E.G.; Vasileva G.K.; Volnova A.I.; Baskunov B.P., 1981., Degradation of monochloroanilines via the meta pathway by *Alcaligenes faecalis*., *Proc. Acad. Sci., USSR*, 254:487-490.
- Surovtseva E.G.; Volnova A.I.; Shatskaya T.Y., 1980., Degradation of mono chlorosubstituted anilines by *Alcaligenes faecalis*., *Mikrobiologiya*, (49):38-42.
- Suzuki M.; Aisawa N.; Okano G.; Takahashi I., 1977., Translocation of polychlorinated in soil into plants: a study by a method of culture of soybean sprouts., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 5:343.
- Swackhamer L.D.; McVeety D.B.; Hites A.R., 1988., Deposition and evaporation of polychlorinated congeners to and from Siskiwit lake, Isle Royale, Lake Superior., *Environ. Sci. Technol.*, 22:664-672.
- Sylvestre M., 1980., Isolation method for bacterial isolates capable of growth on p-chlorobiphenyl., *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:1223.
- Sylvestre M.; Fauteux J., 1982., A new facultative anaerobe capable of growth on chlorobiphenyls., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28:61-72.
- Sylvestre M.; Masse R.; Massier F.; Fauteux J.; Bisailon J.G.; Beaudet R., 1982., Bacterial nitration of 4-chlorobiphenyl., *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:871-877.
- Tahara S.; Hafsah Z.; Ono A.; Asaishi E.; Mizutani J., 1981., Metabolites of 2,4-dichloro-1-nitrobenzene by *Mucor javanicus*., *Agric. Biol. Chem.*, (45):2253-2258.
- Takase I.; Onori T.; Minoda Y., 1986., Microbial degradation products from biphenyl-related compounds., *Agric. Biol. Chem.*, (50):681-686.
- Tanabe S.; Kannan K.; Wakimoto T.; Tatsukawa R., 1987., Methods for the determination of three toxic non-ortho-chlorine substitute coplanar PCB in environmental samples at part-per-trillion levels., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 29:199.
- Tanabe S.; Hidaka H.; Tatsukawa R., 1988., PCBs and chlorinated hydrocarbon pesticides in Antarctic Atmosphere and hydrosphere., *Chemosphere*, 12(2):277-288.
- Tanabe S.; Kannan N.; Wakimoto T.; Tatsukawa R.; Okamoto K.; Masuda Y., 1989., Isomer specific determination and toxic evaluation of potentially hazardous coplanar PCBs, dibenzofurans and dioxins in the tissues of "Yusho" PCB poisoning victim and in the causal oil., *Toxicol. Environ. Chem.*, 24:215.
- Tanabe S.; Tatsukawa R., 1980., Chlorinated hydrocarbons in the north Pacific and Indian Oceans., *Journal of the Oceanographic Society of Japan*, 36:217-226.
- Taylor B.F.; Campbell W.L.; Chinoy I., 1970., Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism., *J. Bacteriol.*, 102:430-437.
- Teichman J.; Bevenue A.; Hylin J.W., 1978., Separation of polychloro biphenyls from chlorinated pesticides in sediments and oyster samples for analysis by gas chromatography., *J. Chromatogr.*, 151:155.
- Thome J.P.; Vandaele Y., 1987., PCB trace enrichment from contaminated natural water at the sub level on C-18 microcartridges., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 29:95-103.

- Tiedje J.M.; Duxbury J.M.; Alexander m.; Dawson J.E., 1969., 2,4-D metabolims: pathway of degradation of chlorocatechols by *Arthrobacter sp.*, *J. Agric. Food Chem.*, (17):1021-1026.
- Tiedje, M. J; Quensen III F. J.; Chee-Sanford, J; Schimel; Boyd S. (1994) "Microbial Reductive Dechlorination of PCB's". *Biodegradation* 4:231-240.
- Tillitt D.E., Ankley G.T.; Verbrugge D.A.; Giesy J.P.; Ludwig P.; Kubiak T.J., 1991a., H4IIE Rat Hepatoma Cell Bioassay-Derived 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Equivalents in colonial Fish-Eating waterbird eggs from the great lakes., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 21:91.
- Tillitt E.D.; Giesy P.J.; Ankley T.G., 1991b., Characterization of the H4IIE hepatoma cell bioassay as tool for assessing toxic potency of planar halogenated hydrocarbons in environmental samples., *Environ. Sci. Technol.*, 25:87.
- Timberlake D.L.; Strand S.E.; Williamson K.J., 1988., Combined aerobic heterotrophic oxidation, nitrification and denitrification in a permeable-support biofilm., *Water Research.*, 22(12):1513-1517.
- Tomaszewski J.E.; Jerina D.M.; Daly J.W., 1975., Deuterium isotope effects during formation of phenols by hepatic monooxygenases. Evidence for an alternative to the arene oxide pathway., *Biochemistry.*, 14(9):2024-2031.
- Tomlinson T.G.; Snaddon D.H.M., 1966., Biological oxidation of sewage by films of microorganisms., *Int. J. Air and Water Poll.*, 10:865-881.
- Trulear M.; Characklis W., 1982., Dynamics of biofilms processes., *Journal WPCF.*, 54(9):1228-1301.
- Tsao G.F., 1968., Simultaneous gas-liquid interfacial oxygen absorption and biochemical oxidation.
- Tucker E.S.; Saeger V.W., Hicks O., 1975., Activated sludge primary biodegradation of polychlorinated biphenyls., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 14:705-713.
- Tueber M.; Brodisch K.E., 1977., Enzymatic activities of activated sludge., *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 4:185-194.
- Tuinstra T; Traag W.A.; Keukens H.J., 1980., Quantitative determination of individual chlorinated biphenyls in milk fat by splitless glass capillary chromatography., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63:952.
- Tulp M.T.M.; Schmitz R.; Hutzinger O., 1978., The bacterial metabolism of 4,4' dichlorobiphenyl and its suppression by alternative carbon sources., *Chemosphere.*, 7:103.
- Tumasonis C.F.; Bush B.; Baker F.D., 1973., PCB levels in egg yolks associated with embryonic mortality and deformity of hatched chicks., *Arch. Envir. Cont. Toxic.*, 1:312-314.
- Tunistra L.G.M.; Van Rhijn J.A.; Roos A.H.; Traag W.A.; Van Mazijk R.J.; Kolkman P.J.W., 1990., Determination of planar chlorobiphenyls in animal fat., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13:797.
- Twefik M.S.; Evans W.C., 1966., The metabolism of 3,5 dinitro cresol (DNOC) by soil microorganisms., *Biochem. J.*, 99:31.
- Van der Velde, G.E.; Haan, W.; Liem, D.k., 1992., Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls and pesticides from soil. Comparison with other extraction methods., *Journal of Chromatography.*, 626(1):135-143.
- Van Dort H.M.; Bedard D.L., 1991., Reductive ortho-dechlorination and meta-dechlorination of a polychlorinated biphenyls congener by anaerobic microorganisms., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:1576-1578.
- VanDer Meer J.R.; Vos W.M.; Hatrayama S.; Zehnder A.J.B., 1992., Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds., *Microbiol. Rev.*, 56:677-694.

- VanDijk L.; Roncken G.C.G., 1997., Membrane bioreactors for wastewater treatment: The state of the art and new developments., *Wat. Sci. Technol.*, 35(10):35-41.
- Vodicnik M.J.; Lech J.J., 1980., The transfer of 2,4,5,2',4',5 hexachlorobiphenyl to fetuses and nursing off spring. Deposition in pregnant and lactating mice and accumulation in young., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54:293-300.
- Vogel T.M.; Grbic-Galic., 1986., Incorporation of oxygens from water into toluene and benzene during anaerobic fermentative transformation., *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:200-202.
- Vojinovic M.M.; Marajanovic P.; Buzarov D.; Pavkov S.; Dimitrijević L.; Miloradov M., 1992., Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in selected fish species as a indicator of the pollution of aquatic resources in Vojvodina Yugoslavia., *Water Science. Technology.*, 26(9-11):2361-2364.
- Voyksner D.R.; Bursley T.J.; Pack W.T.; Porch L.R., 1986., Development of methane positive chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry procedures to determine polychlorinated biphenyls., *Anal. Chem.*, 58(3):621-626.
- Wakeham S.G.; Davis A.C.; Karas J.L., 1983., Mesocosm experiments to determine the fate and persistence of volatile organic compounds in coastal seawater., *Environ. Sci. Technol.*, 17:611-617.
- Walker N.; Harris D., 1969., Aniline utilization by a soil pseudomonad., *J. Appl. Bacteriol.*, 32:457-462.
- Wallnöffer P.R.; Engelhardt G.; Safe S.; Hutzinger O., 1973., Microbial hydroxylation of 4-chlorobiphenyl and 4,4'-dichlorobiphenyl., *Chemosphere.*, 2:69.
- Webb G.R.; McCall C.A., 1973., Quantitative PCB standard for electron capture gas chromatography., *Journal of Chromatographic Science.*, 11:366-373.
- Weber J.B.; Mrozek E., 1979., Polychlorinated biphenyls: Phytotoxicity, Absorption and translocation by plants, and inactivation by activated carbon., *Bull. Envir.Cont. Toxic.*, 23:187-195.
- Welsch F., 1983., Effects of polychlorinated biphenyls on the expression of embryo toxicity caused by model teratogens, In: PCBs human and Environmental Hazards., *F.M.D'Itri and Kamrin M.A. (Eds).*, Butterworth Pr., 253-276.
- Weltman R.H.; Norback P.H., 1979., Hepatic ultrastructural changes in rats exposed to polychlorinated biphenyl isomers: hexachlorobiphenyl-induced neoplastic nodules., *Toxic.Appl. Pharm.*, A181.
- Wigmore G.J.; Ribbons D.W., 1980., *p*-Cymene pathway in *Pseudomonas putida*: selective enrichment of defective mutants by using halogenated substrated analogs., *J. Bacteriol.*, (43):816-824.
- Williams R.J.; Evans W.C., 1975., The metabolism of benzoate by *Moxerella sp.* through anaerobic nitrate respiration., *J.Biochem.*, 148:1-10.
- Williams R.J.; Evans W.C., 1973., Anaerobic metabolism of aromatic substrates by certain microorganisms., *Biochem. Soc. Trans.*, 1:186-187.
- Williams W.A., 1994., Microbial reductive dechlorination of trichlorobiphenyls in anaerobic sediments and soils., *Environ. Sci. Technol.*, 20:717-725.
- Winger P.V.; Sireckman C.; May T.W.; Johnson W.W., 1984., Residues of organochlorine insecticides, polychlorinated biphenyls, and heavy metals in biota from Apalachicola River, Florida., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67:325.

Wiseman A.; Gondal J.A.; Sims P., 1975., 4-Hydroxylation of biphenyl by yeast containing cytochrome P-450: radiation and thermal stability, comparisons with liver enzymes (oxidized and reduced forms), *Biochem. Soc. Trans.*, 3:278.

Wittlinger R.; Ballschmitter K., 1990., Studies of the global baseline pollution XIII. C6-C14 organohalogenes (alpha and g-HCH, HCB, PCB, 4,4'-DDt, 4''-DDE, *cis* and *trans* nonachlor, anisols) in the lower troposphere of the southern Indian Ocean., *Fresenius'z Anal. Chem.*, 336:193.

Wong P.T. S.; Kaiser K.L.E., 1975., Bacterial degradation of polychlorinated biphenyls II. rate studies., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 113:249.

Wyndham C.J.; Devenish J.; Safe S., 1976., The *in vitro* metabolism, macromolecular binding and bacterial mutagenicity of 4-chlorobiphenyl, a model PCB substrate., *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.*, 15:563-570.

Wyss P.A.; Muhlebach S., 1982., Pharmacokinetics of 2,2',4,4',5,5'hexachlorobiphenyl (6-CB) in rats with decreasing adipose tissue mass., *Drug. Metab. Disp.*, 10:657-661.

Yagi O.; Sudo R., 1980., Degradation of polychlorinated biphenyls by microorganisms., *J. Water Pollut. Control. Fed.*, 52:1035-1043.

Ye D.; Quensen F.J.; Tiedje M.J.; Boyd A. S., 1992., Anaerobic dechlorination of polychlorinated (Aroclor 1242) by pasteurized and ethanol treated microorganisms., *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(4):1110-1114.

You I.S.; Bartha R., 1982., Metabolism of 3,4-dichloroaniline by *Pseudomonas putida*., *J. Agric. Food. Chem.*, 30:274-277.

You I.S.; Bartha r., 1982., Stimulation of 3,4-dichloroaniline ineralization by a aniline., *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:678-681.

Zaitsev G.M.; Karasevich Y.N., 1982., utilization of 2-chlorobenzioc acid by *Pseudomona cepacia*., *Mikrobiologiya.*, (53):75-80.

Zell M.; K. Ballschmitter., 1980., Baseline studies of the global pollution II. global ocurrence of hexachlorobenzene (HCB) and polychlorocophenes (Toxaphenes RTM) (PCC) in biological samples., *Fresenius'z Anal. Chem.*, 300:387.

Zeyer J.; Kearney p.C., 1982., Micrbial degradation of parachloroaniline as sole carbon and nitrogen source., *Pest. Biochem. Physiol.*, 17:215-223.

Zeyer J.; Kearney P.C., 1983., Microbial metabolisms of ¹⁴C-nitroanilines to ¹⁴C-crabon bioxide., *J. Argic. Food. Chem.*, (31):304-308.

Zeyer J.; Kearney P.C., 1984., Degradation of o-nitrophenol and m-nitrophenol by a *Pseudomona putida*., *J. Agric. Food. Chem.*, (32):238-242.

Zieminski S.A., 1971., Behavior of gas bubbles in aqueosus electrolyte solution., *Chem. Eng. Sci.*, 26:509.

Zylstra G.J.; Gibson D.T., 1989., Toluene degradation by *Pseudomona putida* F1: nucleotide sequence of the *tolCIC2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*., *J. Biol. Chem.*, 264:1490-1496.

CONGRESOS

Atkinson B.; Davies I.J., 1974., The overall rate of substrate uptake reaction by microbial films Part (I) A. Biological reaction rate equation., *Trans. Inst. Chem. Engrs.*, 52-248.

- Doelman P., 1994., European perspectives of field research on bioremediation; special attention to the Netherlands., *15 Congreso Mundial de la Ciencia del Suelo*.
- Eguía E.; Tejero M. J.I., 1992., Biopelícula sobre soporte permeable: Eliminación conjunta de carbono orgánico y nitrógeno., *V congreso de Marina Civil., Cadiz, España*.
- Erickson B.D.; Mondello F.J., 1991., Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the biphenyls-dioxygenase from the PCB-degradung *Pesudomonas sp.* strain LB400., *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol., 91 meet. 284*.
- Farrel R.; Chakrabarty A.M., 1979., Degradative plasmids: molecular nature and mode of evolution, in Plasmid of medical, environmental and commercial Importance., *Timmis K.N. & Puhler A., Eds., Elsevier/North-Holland, Amsterdam., 97*.
- Fonseca D.A.; Almeida S.J.; Crespo G.S.; Reis M.A., 1996., Monitoring of biofilms for volatile organic compounds degradation., *Simposium of Biofilm., Copenhagen, Den.*
- Freitas D.S.M.; Strachan F.L.; Kruger A.; Livingston G.A., 1996., Membrane attached biofilms: measurement and control of biofilm thickness., *Simposium of Biofilm., Copenhagen, Den.*
- Gibson D.T., 1976., Initial reaction in the bacterial degradation of aromatic hydrocarbons., *Zbl. Bakt. Hyg. I. ABT. Orig.B., 162:157-168*.
- Gschobl T.; Nerger C.; Schleyppen P.; Wilderer P.A., 1996., Kontinuierlich und intermittierend betriebene biofiltration vergleichende untersuchungen zur biologischen abwasserreinigung., *Proceedings of the 29., Essener Tagung., Erfurt*.
- Hamdy M.K.; Lin Y.C., 1983., Biodegradation of Chlorinated Hydrocarbons, presented at *83rd Annual Meeting American Society Microbiology, New Orleans, march 6*.
- Kamp R.F.; Chakrabarty A.M., 1997., Plasmids specifying p-chlorobiphenyl degradation in enteric bacteria, in Plasmids of medical, Environmental and commercial Importance., *Timmis K.N. & Puhler A., Eds., Elsevier/North-Holland, Amsterdam*.
- Kornegay B.H.; Andreas J.F., 1976., Characteristics and kinetics of biological film reactors., FWPCA Final Report., Grant W.P-01181., *Dept. Environ. Systems Engi., Chemson Univ. Chemson SC*.
- Kuhn E.P.; Suflita J.M., 1989., Dehalogenation of pesticides by anaerobic microorganisms in soil and froundwater-A review. In Sawhney B.L., Brown K. (eds). Reactions and movements of organic chemicals in soils. Madison, WI: *Soil Science Society of America and America Society of Agronomy., pp. 111-180*.
- La Mota E.J.; Hickey R.F., 1980., Factors affecting attachment and development of biological films onsolid medioa., *Proc. First. National Symposium/workshop on Rotating Biological Contactor Technology II., 803-827*.
- Oremland R.S.; Capone D.G., 1988., Use of "specific" inhibitor in biogeochemistry and microbial ecology., In Marshall K.C. 8ed): *Advances in Microbial Ecology., New York. Plenum., (10):285-383*.
- Peys K.; Diels L.; Leysen R.; Vandecasteele C., 1996., Development of a membrane biofilm reactor for the degradation of chlorinated aromatics., *Simpoium of Biofims., Copenhagen, Den.*
- Pravasant P.; Strachan F.L.; Freitas dos Santos M.L.; Pistikopoulos N.E.; Livingston G.A., 1996., Modelling of membrane attached biofims used treating tixic voc containing wastewaters., *Simposium of Biofilm, Copenhagen, Den.*

Quensen F.J.; Tiedje M.J.; Boyd A.S.; Enke C., 1990., Evaluation of the suitability of reductive dechlorination for the bioremediation of PCB-contaminated soil and sediments, In: soil decontamination using biological process., *Dechema, Frankfurt and Main Germany.*, 91-101.

Sharma A.; Chunn C.D.; Rothme R.K.; Unterman R., 1991., Studies on bacterial degradation of polychlorinated biphenyls: optimization of parameters for in vivo enzyme activity., *Abstr., Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 91 meet. 284.

Stalling D.L.; Johnson J.; Huckins J.N., 1975., In lectures held at the IUPAC., *Third International Congress of Pesticide Chemistry, Helsinki.*, pp12.

Tejero I.; Eguía E.; Vidart T.; Jácome A.; Osa J.J.; Lorda I., 1997., Reactores de biomembrana para la depuración aerobia de aguas residuales., *V Congreso de Ingeniería Ambiental., PROMA 97 Feria Internacional de Bilbao, España.*

Tejero M. J.I.; Jácome A.; Lorda I., 1994., Tratamientos biológicos I: Procesos de biopelícula fija. Curso de aguas residuales y explotación de estaciones depuradoras. *Centro de estudios y experimentación de obras públicas., España.*

Tejero M. J.I.; Jácome B.A.; Lorda I., 1995., Experiencias sobre biopelículas: Reactores basados en biopelícula sobre membrana permeable a gases., Equipo de Biopelícula, Depto de ciencias y Técnicas del Agua y Medio Ambiente., Universidad de Cantabria, España., *Jornadas técnicas hispano-alemanas de tratamientos avanzados de agua.*

Vidart T.; Eguía E.; Tejero M.J.I., 1993., Biofilm process with a support permeable to gases using air., *Second International Specialized Conference on Biofilm Reactors., Paris, France.*, pp.813-814.

LIBROS

Abramovicz D.A.; Brown J.F.; Harkness M.R.; O'Donnell M.K., 1995., In situ anaerobic PCB dechlorination and aerobic PCB biodegradation in Hudson River sediments. In Hickey R.F. (ed): The implementation of biotechnology in industrial waste treatment and bioremediation., *Lewis Publishers.*, pp.57-92.

Aggarwal P.K.; Means J.L.; Hincee R.E., 1991., Formulation of nutrient solutions for in situ biodegradation, pp. 51-66. In R.E. Hincee R.E. and R.F. Olfenbuttel (eds.), in situ bioreclamation: Application and investigation for hydrocarbon and contaminated site remediation., *Butterworth-Heinemann, Boston.*

Angel A. and Sheldon H., 1965., Adipose cell organelles. Transport., *Ann. N. Acad. Sci.*, 131:157-176.

Ballou D.P., 1982., Flavoprotein monooxygenases. In Flavins and Flavoproteins., Ed. V. Massey and C.H. Williams., *Elsevier-North Holland, New York.*, pp.301-310.

Barlet R.; Pierre L.J., 1970., Química Orgánica., Primera Edición., *Edit. Alhambra, S.A.*

Becerril A.J.; Navarrete R.M.A., 1993., Recopilación, aplicación y evaluación de las tecnologías de estabilización/solidificación para el tratamiento de residuos peligrosos., Coordinación de Investigación., *Area de riegos químicos., Cenapred., México.*, p.61.

Bedard D.L.; Quensen F.J., 1995., Microbial Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls: In Microbial transformation and degradation of toxic organic chemical., Young L.Y. and Cerniglia E.C Edit., *Wiley-Liss publication.*, pp. 127-216.

Beyer H.; Walter W., 1987., Manual de Química Orgánica., 19a Edición., *Edit. Reverté.*

- Bidleman T.F.; Rice C.P.; Olney C.E., 1976., High molecular weight chlorinated hydrocarbons in the air and sea: Rates and mechanisms of air/sea transfer., in *Merine Pollutats Transfer., H.L. Windom and R.A. Duce, Eds. Lexington Books., pp.323-351.*
- Bletchly J.D.,1984., In: *Proceedings PCB-Seminar (Barros M.C. Könemann H. And Visser R. Edits), pp.343-366,Ministry VROM, the Hague.*
- Brewster Q. R.; McEwen E.W., 1963., *Química Orgánica, Cuarta Edición., Edit. Médico Quirúrgica. Buenos Aires, Argentina.*
- Brinkman U.A.; De Kok A., 1980., Production properties and usage. In: *Halogenated biphenyls, terphenyls, dibenzodioxins an related products, Amsterdam, Elsevier Biomedical Press., pp. 1-40.*
- Brown J.F., 1990., Identification of environmental PCB transformation processes. In Hutzinger O, Fiedler H. (Eds): *Dioxin '90-EPRI Seminar short papers, orhanohalogen compounds., Bayreuth, Germany: Ecoinforma Press, Vol 2, pp.21-24.*
- Cerniglia E.C.; Somerville C.C., 1995. , Reductive metabolism of nitroaromatic and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons., Pp. 95-115. In: *Biodegradation of nitroaromatic compounds., Edit by J.C: Spain, Plenum Press, New York,*
- Colberg S.J.P.; Young Y.L., 1995., Anaerobic degradation of nonhalogented homicyclic aromatic compounds coupled with nitrate, iron, or sulfate reduction., microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals., *Wiley-Liss. Inc., pp.307-330.*
- Colección Española de Cultivos Tipo., 1990., *Catálogo de Cepas., Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas., Universidad de Valencia., España. Edit. C.Dawson; C.Belloch; lopez M.D.; F. Uruburo.*
- Cunningham A.B., 1989., Hydrodynamic and solute transport at the fluid biofilm interface. structure and function of biofilms., Ed. W.G. Characklis and P.A. Wildered., *Dahlem Worksop Reports., Berlin. John Wiley and Sons.*
- Chakrabarty A.M., 1980., Plasmids and dissimilation of synthetic environmental pollutant, in *Plasmids and Transposons: Environmental Effects and Maintenance Mechanism, Stuttard C. & Rozee K.R., Eds., Academic press, New York., 21.*
- Chang, Y.P.D.; Sorbo, W.N., 1988., Evaluation of a pilot scale circulating bed combustor with a surrugate hazardous waste mixture., *Incinerating Hazardous Waste., Harry Freedman Edt. Technomic Publishing Co. p. 271-277.*
- Characklis W.G.; Marshall K.C., 1990., *Biofilms., John Wiley and Sons Edit.*
- Dagley S., 1994., *Microbial metabolisms of aromatic compounds., Comprehensive Biotechnology., Seccion 2., Edit. Pergamon. Press., pp.483-505.*
- Dobson S.; Van Esch G.J., 1993., *Polychlorinated Biphenyl and Terphenyls., Environmental Health Criteria Series 140., Second Edition.,World Health Organization, Genova.*
- Eisenreich S.J.; Looney B.B.; Hollod G.J., 1983., *PCBs in the Lake Superior Atmosphere 1978-1980., Charper 7 in Physical Behavior of PCBs in the Great Lakes., D. Mackay, S.Peterson, S.J.Eisenreich and M.S. Simmons, Eds. (Ann Arbor, MI Ann Arbor Science Publishers, Inc., pp.442.*
- Erickson M.D., 1986., *Analytical Chemistry of PCBs., Ann Arbor Science Book., Butterworth Publisher., Boston ., USA.*
- Fieser F.L.; Fieser M., 1960., *Química Organica., Segunda Edición., Edit. Grijalbo, S.A.*

- Floodgate G.D., 1979., Nutrient limitation, pp.107-119. In A.W. Bourquin and P.H. Pritchard (eds), Michigan degradation of pollutants in marine environments. EPA-66019-012. *Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, F.L.*
- Freestone, F; Hazal, R.; Wilder, I.; Brugger, J.; 1988. Evaluation of on site incineration for cleanup of Dioxin-contaminated materials. Incinerating Hazardous Waste. *Harry Freedman Edit. Technomic Publishing Co. p. 285-303.*
- Furukawa K., 1982., Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs), in Biodegradation and Detoxification of Environmental Pollutants., Chakrabarty, A. M., De., *CRC Press, Boca Raton, Fla.*: 33.
- Giam C.S.; Chan H.S.; Neff G.S., 1976., Concentration and fluxes of phthalates, DDT, and PCBs to the Gulf of Mexico., In Marine Pollutant Transfer., *H.L. Windom and R.A. Duce, Eds. Lexington Books., pp. 375-386.*
- Giamporcaro D.E., 1991., Biorremediation waste control more promising., *Reprint. BioWorld. Io Publising, San Mateo Ca.*
- Giamporcaro D.E., 1997., Limitaciones de la legislación política vigente: Regulación de la Biorrecuperación de Residuos Peligrosos., En: Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos., *Morris Levin y Michael gealt., edit. McGraw Hill.*
- Gosselin H.; Gleason S., 1979., Clinical toxicology of commercial products acute poisoning., *Williams and Williams., 4ta. Edit.*
- Grant D.L., 1983., Regulation of PCBs in Canada In: PCBs human and environmental hazards. *D'Itri M.f and Karrim A.M. Edit. Butterworth Publishers., USA.*
- Hart H.; Hart J.D.; Craine E.L., 1995., Química Orgánica., Novena Edición., *Edit. McGraw-Hill, México.*
- Herres W., 1987., HRGH-FTIR: Capillary gas Chromatography Fourier-Transformation infrared spectroscopy., *Hüthig Heidelberg., Chap.13. p.107.*
- Hutzinger O. Safe S. And Zitko V., 1974., The chemistry o PCB. *CRC Press, Cleveland, OH.*
- International Agency for Research on Cancer., 1978., IARC Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human polychlorianted niphenyls and polybrominated biphenyls., *Vol. 18 Lion France., pp.43-103.*
- Iwai S.; Kitao T., 1994., Wastewater treatment with microbial film., *Technomic Publishing company Inc., USA.*
- Jenkins D., 1963., Sewage treatment., Cap. 15 In Biochemistry of industrial microorganisms., *Edit. Rainbow, C. and Rose A.H., Academic Press., 508-536.*
- Kaplan D.L., 1990., Biotransformation pathways of energetic organonitro compounds., pp.155-182. In D.Kamely A. Chakrabarty and G.S. Omenn (eds), *Advances in Applied Biotechnology 4: Biotechnology and biodegradation, Portfolio Publishing, The Woodlands, Tex.*
- Keith H.L. 1989., Principles of environmental sampling., *American chemical society., Washintong, D.C.*
- Kimbrough D.R.; Jensen A.A., 1989., Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products., *Topics in Environmental Health. 2nd. edit. Vol.4. Elsevier., Second Edit.*
- Kimbrough R.D., 1980., Environmental Pollution of air, water and soil., Charper 3 in Halogented biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and related products., R.D. Kimbrough Ed., *Elsevier/North-Holland Biomedical Press., New york., pp.77-80.*
- Kolak, P.N.; Barton, G.T.; Lee, C.CH.; Peduto, F.E., 1988., Hazardous waste destruction using plasma arc technology., Incineration Hazardous Waste., *Harry Freedman Edit. Technomic Publishing Co. p. 279-283.*

- Kosaric N.; Cairns W.L.; Gray N.C., 1987., *Biosurfactans and biotechnology*, Surfactans science series, *Marcel Dekker, New York*. Vol 25.
- LaGrega M.D.; Buckingham P.L. y Evans J.C., 1996., *Gestión de Residuos Tóxicos, Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos*, Edit. *McGraw-Hill*. Pp.104-120.
- Levin M.; Gealt M.A., 1997., *Biotratamiento de residuos peligrosos: Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones*, Editorial McGraw Hill, España.
- Martínez, O. C., 1988., *Residuos Tóxicos y Peligrosos*, Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo., *Dirección General del Medio Ambiente*, Madrid, España., pp.62-70.
- McMurry J., 1994., *Química Orgánica*, Tercera Edición., Edit. *Iberoamericana*. México.
- Morrison T.R.; Boyd N.R., 1990., *Química Orgánica*, Quinta Edición., *Addison-Wesley Iberoamericana*, S.A.
- Mullin M.D.; Pochini C.M.; Safe S.H.; Safe S., 1984., *Analysis of PCBs using specific isomer high-resolution capillary gas chromatography*, Charper 12 in *PCB:s Human and Enviromental Hazards*, F.M. D'Itri and kamrin M.A. Eds. *Boston Butterworth Publishers*, pp. 165-176.
- Nadim L.M.; Schocken M.J.; Higson F.K.; Gibson D.T.; Bedard D.L.; Bopp L.H.; Mondello F.J., 1988., *Bacterial oxidation of polychlorianted biphenyls*, Proc. U.S. EPA. Annu. Res. Symp. Land Disposal, Remedial Action., *Incineration Treat. Hazard. Waste*, 13th, Cincinnati, Ohio.
- Neckers C.D.; Doyle P.M., 1980., *Química Orgánica*, Edit. *C.E.C.S.A.*, México.
- Pellizzari E.D.; Tomer K.B.; Mosseley A.M., 1981., In Keith L.H. (Editor). *Advances in the identification and Analysis of organic pollutants in water*, *Ann Arbor Sci. Publ.* 197.
- Rappe C.; Marklund S.; Kjeller L.O.; Bergqvist P.A.; Hansson, M. 1985., *Composition of PCDFs formed in PCB fires*. In: *Simposium on chlorinated dioxins and dibenzofurans in the total environment II*, Boston, Massachusetts, *Butterworth Publishers*, pp. 401-424.
- Rochkind-Dubinsky L.M.; Sayler S.G. Blackburn W.J., 1986., *Microbial decomposition of chlorinated aromatic compounds*, *Marcel Dekker Inc. N.Y.*, p. 315.
- Rosemberg E., 1986., *Microbial surfactants*, *CRC critical Reviews in Biotechnology*, vol 3. No.2
- Safe H. S., 1985., *Microbial degradation of polychlorinated biphenyl*. *Microbial Degradation of organic compounds*, *Dekker*, vol.13 pp.361-369.
- Safe S., 1990., *Polychlorianted biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Enviromental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs)*, *CRC. Crit. Rev. Toxicol.*, 21:51-88.
- Safe S.; Hutzinger O.; Dedrick R.L.; Hansen L.G.; Hayes M.A., 1987., *Polychlorinated biphenyls (PCBs): mammalian and environmental toxicology*, *Environmental Toxin Series*, *Spring-Verlag*.
- Schlegel G.H., 1975., *Microbiología General*, *Edicioens Omega S.A. Barcelona España*.
- Shaw G., 1993., *Polychlorinated biphenyls (PCBs) effects on the humans and the environment*, *Academic Press Inc*. Pp.611-625.
- Smith P.R., 1992., *A primer of environmental toxicology*, *Environmental toxicology*, *Lea. Febiger*, Philadelphia.

- Stalling D.L., Huckins J.N.; Petty J.D.; Johnson J.L.; Sanders H.O., 1979., An expanded approach to the study and measurement of PCB and selected planar halogenated aromatic environment pollutants., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 320:48.
- Stall J.D.; Aust D.S., 1995., Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*., pp. 117-133 In: Biodegradation of nitroaromatic compounds., Edited by J.C. Spain, Plenum Press, New York.
- Streitwieser A.; Heathcock H.C., 1990., Química Orgánica., Tercera Edición., Edit. McGraw-Hill.
- Tatsukawa R., 1976., Production, Use and Properties of the PCB Poisoning and Pollution, *Kodansha/Academic Press, Tokio/New York*, pp.148-152.
- Testa B., 1995., The metabolism of drugs and other xenobiotics: Biochemistry of redox reactions., *Academic Press*.
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry., 1990., Vol.A6.
- Waid S.J.; D. Phill., 1987., PCB's and the environmental., Vol. III., *Academic CRC Press*
- Wassermann M.; Wassermann D.; Cucos S. and Miller H.J., 1979., World PCBs map: Storage and effects in man and his biologic environment in the 1970's., *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 320:69-124.
- Weininger J.S.; Stermitz R.F., 1988., Química Orgánica., Edit. Recerté S.A. México.
- Wheland W.G., 1963., Química Orgánica Avanzada., Tercera Edición., Edit. Continental S.A.
- Wilson N.K.; Anderson M., 1973., Carbon-13 and proton Magnetic Resonance Studies of chlorinated biphenyls., In mass spectrometry and MNR spectroscopy in pesticide chemistry., R.Haque & F.J. Biros Eds. *Plenum Press.*, pp.197-218.
- Winkler M., 1986., Tratamiento biológico de aguas de desecho., *Editorial Limusa*.
- ## INFORMES
- Appleby A., 1976., Atmospheric freons and halogenated compounds., U.S. Environmental Protection Agency., Office of Research and Development., *EPA-600/3-76-108*.
- Baker J.T.B., 1991., Extraction of PCBs from water., *Baker Bond Application Note*.
- Bedard D.L.; VanDort H.M.; Bunnell S.C.; Principe J.M.; DeWeerd K.A.; May R.J.; Smullen L.A., 1993., Stimulation of reductive dechlorination of Aroclor 1260 contaminant in anaerobic slurries of Woods Pond sediments. In Rogers J.E., Abramovicz D.A. (eds): Anaerobic dehalogenation and its environmental implications. Abstracts of the 1992 American Society for Microbiology Conference. Athens, G.A: *Office of research and development, U.S. Environmental Protection Agency.*, 19-21.
- Bellar T.A. 1989., Methods for determination of organic compounds in drinking water. Method 508A. Screening for polychlorinated biphenyls by perchlorination and gas chromatography., Revision 1.0. Environmental Monitoring Systems laboratory office of research and development U.S., *Environmental Protection Agency.*, Cincinnati Ohio.
- Betchly J.D., 1985. Study of measures to avoid dispersion into the environment of PCBs and PCTs from existing installations; *Report to the CEC. Aylesbury*.
- BOE. No. 102., 1989., Orden de 14 de abril de 1989 sobre gestión de los policlorobifenilos y policloroterfenilos., España.

- Burrus R.P., 1977., Assessment of the Environmental and Economic Impacts of the Ban on imports of PCBS. EPA-560/6-77-007., *Environment Protection Agency, Washintong D.C.*
- Code federal Regulations 40., 1990., Protection of Environmental., *Parts 700 to 789., USA.*
- Characklis W.G.; Wildered P.A., 1989., Structure and function of biofilms. Report of the Dahlem workshop on structure and function of biofilm., *Berlin John And Sons Edit.*
- Diario Oficial., 1988., Acuerdo por el que se expide la Norma Técnica Ecológica NTE-CRP-001/88 que establece los criterios para la determinación de residuos peligrosos y el listado de los mismo.
- Directiva 76/403/CEE del Consejo de la Comunidad Europea. Relativa a la Gestión de los policlorobifenilos y policloroterfenilos., *Diario de las Comunidades Europeas. No. L108/2 15/Vol.01. pp.161-162.*
- Durfee R.L., Contos G.; Whitmore F.C.; Barden J.D.; Hackman E.E., Westin R.A., 1976., PCBs in the United States, Industrial Use and Environmental Distribution. EPA-560/6-76-005, *Environmetal Protection Agency, Washintong D.C.*
- Erickson M.D.; Cole C.J., Flora J.D., Gorman P.G.; Haile C.L.; Hinshaw G.D.; Hopkins F.C.; Swanson., 1984., Thermal degradation products from dielectric fluids., U.S. Environmental Protection Agency., *Washington, D.C., EPA 560/5-84-009; NTIS No. PB 85/3835.*
- Federal Register Rules and Regulations. 1984. 49(209):94-173.
- Forrest, R.A. 1987. PCB's in eletrical equipment a growing concern., *Professional safety., pp.141-156.*
- INE-Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca., 1995a., Bifenilos Policlorados (BPCs), Dirección General de Residuos, Materiales y Riesgo., *Instituto Nacional de Ecologia., Dirección de Asuntos Fronterizos y Promoción Industrial., pp.7-9.*
- Instituto Nacional de Ecologia., 1995b., Bifenilos Polichlorados (BPCs), Dirección General de Residuos, Materiales y Riesgos, Dirección de Asuntos Fronterizos y Promocion Industrial, *Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca.*
- Kalas, R.S., 1990., PCB Regulation-getting Ready for 1990., *Marketing Manager Power Generation Marketing.*
- Mackay D.; Paterson S., 1982., Fugacity models for predicting environmental behaviour of chemicals, *Report to Environment Canada., Contract O.SU-81-00163.*
- MacLeod K.E., 1979., Sources of emissions of polychlorinated biphenyls into the ambient atmosphere and Indoor Air., U.S. *Environmental Protection Agency., Report No. EPA-600/4-79-022.*
- National Institute for Occupational Safety and Health., 1977., Criteria for a recommended standard occupational exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs), U.S. Department of Health Education and Welfare., *DHEW (NIOSH) Publication No. 77-225., pp.224.*
- Roberts J.R.; Rodgers D.W.; Bailey J.R. and Roke M.A., 1978., Polychlorinated biphenyls Biological Criteria for an Assessment of their effects on Environmental Quality., *National Research Council of Canada Publication NRCC 16077.*
- Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecologia., 1990., *Gaceta Ecológica., Vol. II. No.II.*
- Strachan W.M.J., 1988., Polychorianted biphenyls (PCBs) fate and effects in the canadian environment., prepared for Toxic Chemical steering Committee Canadian Council of the Resource and Environment Ministers., Conservation and Protection Environment Canada. *Environmental Protection Series Reports., Report EPS 4/HA/2*

Superfund Innovative Technology Evaluation Programm., Dechlorination., *EPA., Section 6.0., Pp.6-19.*

Tanabe S.; Kawano M.; Tatsukawa R., 1983., Chlorinated hydrocarbons in the Artic, western Pacific, and eastern Indian Oceans., *Transactions of the Tokio University of Fisheries., 5:97-109.*

Task Force., 1976., Background to the regulation of polychlorinated biphenyls (PCB) in Canada., Technical Report 76-1 of the Task Force on PCB to the Environmental Contaminants Committee of Environmental Canada and Health and Welfare Canada.

U.S. National Research Council., 1979., Polychlorinated Biphenyls, report by the Committee on the Assessment of polychlorinated biphenyls in the Environment to the National Research Council, Nat. Academy of Sciences., 182.

US EPA., 1980., Ambient water quality criteria for polychlorinated biphenyls, Washington D.C. *Environmental Protection Agency, pp.211.(EPA 440/5-80-068).*

Valero H.M.A., 1989., El Askarel., Tecnolab., *Comisión Federal de Electricidad., pp.40-46.*

VDLUF A., 1985., Rahmenkonzept für die Routineanalytik von Polychlorierten Biphenylen (PCB), *VDLUF A- Verlag, Darmstadt.*

WHO/EURO., 1985., Organohalogen compounds in human milk and related hazards., Report on a WHO consultation, Bilthoven, Copenhagen., *World Health Organization, Regional Office for Europe (IPC/CEH 501/m05).*

WHO/EURO., 1987., PCB's, PCDDs, and PCDFs: Prevention and control of accidental and environmental exposures., Copenhagen, World Health Organization, *Regional Office for Europe (Environmental Health Series 23).*

WHO/EURO., 1988., PCBs, PCDDs and PCDFs in breast milk: Assessment of risk., Copenhagen, World Health Organization., *Regional Office for Europe (Environmental Health Series 29).*

Winfield T.W., 1989a., Methods for the determination of organic compounds in drinking water. Method 505. Analysis of organohalide pesticides and commercial polychlorinated biphenyl (PCB) product in water by microextraction and gas chromatography., Revision 2.0 Environmental Monitoring system laboratory office of research and development U.S., *Environmental Protection Agency., Cincinnati, Ohio.*

Winfield T.W., 1989b., Methods for the determination of organic compounds in drinking water. Method 508. Determination of chlorinated pesticides in water by gas chromatography with an electron capture detector., Environmental Monitoring Systems Laboratory Office of research and development U.S., *Environmental Protection Agency., Cincinnati, Ohio.*

PATENTES

Advance Refinery Technology., 1990., Degradation of polychlorinated biphenyls., *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office., Nov.1. 1115(1)350.*

American Colloid Co. 1988., Method and apparatus for separating contaminants from fluidizable solids. *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office. Decemb.12. 1097(4):1859-1860.*

American Toxic Disposal Partners., 1988., Methods and apparatus for separating polychlorinated biphenyls from fluidizable solids. *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office. Oct.18. 1095(3):1359.*

Electric Power Research Ins., 1988., Removal of polychlorinated biphenyls by solvent extraction., *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office. August 16. 1093(3):1300.*

General Electric Co., 1988., Apparatus for decontaminating PCB-contaminated dielectric fluids., *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office., Nov.1. 1096(1):326.*

Quadrex HPS Inc., 1987., Process for removing PCB's from electrical apparatus., *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office*. August. 11. 1081(2):857.

Secretary of Navy, U.S.A., 1989., Chemical detoxification of polychlorinated biphenyls; two-step reduction to biphenyl, oxidation to biodegradable dicarboxylic acid., *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark*. Feb.14. 1099(2):873.

Transformer Service Inc., 1990., Dehalogenation of polychlorinated biphenyls and other related compounds., *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office*., March 20. 1112(3):1738.

Westinghouse Electric Co., 1987., Removing residual PCB from transformers; adding vaporized solvent which form low-boiling azeotrope with the polychlorinated biphenyls., *Official Gazette of the United States Patent and Trade Mark Office*., Oct.11. 1082(2):864.

TESIS

Bakke R., 1986., Biofilm detachment., Montana State University., *Doctoral Dissertation*.

Cáceres, P.J.T., 1996., Diseño y construcción de un reactor de fibra tubular (RFT) para la eliminación biológica de fósforo (EFB)., Universidad de Cantabria, España., *Tesis de Maestría*.

Castillo C.P.A., 1998., Eliminación biológica de fósforo y nitrógeno utilizando reactores de fibra tubular (RFT). Universidad de Cantabria, España., *Tesis Doctoral*.

Chavez G. T., 1998., Caracterización de los compuestos aromáticos nitrados producidos como una alternativa fisicoquímica para la transformación de los bifenilos policlorados., DEPFI., Universidad Nacional Autónoma de México, *Tesis de Maestría*.,

Eguía E., 1991., Desarrollo de la biopelícula sobre soporte permeable., Universidad de Cantabria, España., *Tesis Doctoral*.

Mendoza V.P., 1994., Estudio de las tecnologías de eliminación de los bifenilos policlorados (PCB's)., Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias extractivas., Instituto Politécnico Nacional., México., *Tesis*.,

Osa. O. J.J., 1995., Transferencia biológica de oxígeno en biopelículas., Universidad de Cantabria, España., *Tesis de Maestría*.

Salazar C.R., 1994., Desarrollo de un nuevo proceso de biopelícula de lecho aireado sumergido con soporte rígido "BLAS II"., Universidad de Cantabria, España., *Tesis de Maestría*.

Schwieen U., 1984., Bakterieller Abbau von dichloraromaten: Metabolismus von 3,5-dichlorbrenzcatechin., Univ. Göttingen, Fed. Rep. Germany., *PhD Thesis*.

Urriaga M.A.M., 1991., Aplicación de las membranas líquidas soportadas a la recuperación del fenol en módulos de fibras huecas., Universidad del País Vasco, España., *Tesis Doctoral*.

Valenzuela J.C.H., 1993., Estudio de difusividad de sustratos en la biopelícula crecida en un reactor RBSP., Universidad de Cantabria, España., *Tesis de Maestría*.

Vidart T., 1992., Biopelícula en medio de soporte permeable con aportación de aire., Universidad de Cantabria, España., *Tesis Doctoral*.

Ye D.Y., 1994., Characterization of PCB (polychlorobiphenyls) dechlorination by anaerobic microorganisms from Hudson River sediments., Department of Crop. And Soil Sciences., Michigan State University., East Lansing., *PhD. Dissertation.*

Zamora S. M.P., 1996., Factores que influyen en la transferencia biológica de oxígeno en la biopelícula., Universidad de Cantabria, España., *Tesis de Maestría.*

Ziegenfuss S, 1987., The potential use of surfactant an cosolvent soil washing as adjuvant for in-situ acuifer restoration., Rice University, Houston, Texas, USA., *Master Thesis.*

OTROS

Análisis Automatizado de laboratorio., 1985., Método II de extracción líquido-líquido con cromatografía de gases., Itesm., pp. 185-197.

Russel S., 1980., Microbial transformation in aniline and its chlorinated derivatives., *C.A.(92):1524.*

ANEXOS

Matriz Global de Todos los 209 Isómeros de los Aroclors.

- Fila 1 = Número de isómero según IUPAC.
- Fila 2 = Masa de PCBs
- Fila 3 = Masa de PCB nitrado
- Filas 4-14 = Posiciones nitradas (1 indica átomos de cloro, 2 posición del NO₂)

Columnas 1 a 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
188	188	188	222	222	222	222	222	222	222	222	222		
278	278	278	312	312	312	312	312	312	312	312	312		
1	0		1	1	1	1	1	1	1	0			
0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1		
		1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	Para
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
0	0	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
							1						Para
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Columnas 13 a 24

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
222	222	222	256	256	256	256	256	256	256	256	256		
312	312	312	346	346	346	346	346	346	346	346	346		
0	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1		
1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1		
		1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	Para
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0		
0	0	0	0	0	0	1	0	-	0	0	0	1	
	0		1	1	1	1	0	0	-	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
1		1	-	-	-	-	-	-	1				Para
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Columnas 25 a 36

25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256		
346	346	346	346	346	301	346	346	346	346	346	346		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1		
1			1	1	1			1		1		1	Para
0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1		
	0	1		1	0	1	0	1	0	0	0	0	
0	0	0	-	0	0	-	-	1	1	0	0		
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
			1	-	-	1	1	-	-	-	-		Para
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Columnas 37 a 48

37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
256	256	256	290	290	290	290	290	290	290	290	290		
346	346	346	380	380	380	380	380	380	380	380	380		
		0	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0		
1	1	-		1	-	-	-	-	-	1	1	1	Para
0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1		
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0				
	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1		
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		

1		1			1					1		Para
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	1	-	0

Columnas 49 a 60

49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	
380	335	380	380	380	380	380	380	380	380	380	380	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	Para
1	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	
0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
	1		0	0	1		0	0	0	1	-	
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
			-	-	-	-	1	-	-	-	1	Para
1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	

Columnas 61 a 72

61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	
380	335	380	380	380	380	380	380	335	380	380	380	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	-	-	-	1	1	1	1	-	-	-	Para
1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	
	1	0	1	1	-	-	-	1	0	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
		1	1	-	1	-	-	-	1	1	-	Para
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 73 a 84

73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	
290	290	290	290	290	290	290	290	290	324	324	324	
380	380	335	380	380	380	380	380	380	414	414	414	
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	-	-	1	1	-	-	Para
0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	
1		1	0	0	0	0	0	0	-	0	1	
0			1	0	0	0	0	0	1	1	1	
1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	
	1	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	Para
1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 85 a 96

85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	
324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	
414	414	414	369	414	414	414	414	414	414	414	414	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	
			1	-	0	1	0	1	0	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	Para
0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
	0	0	0	1			0	0	1	0	1	

Columnas 97 a 108

97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	
414	369	414	369	414	414	369	369	414	414	414	414	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	
	1		1			1	1			0		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		0	
1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
		1	1					1		1		Para
0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	
0	0			0	1	0	1	0	0	0	0	

Columnas 109 a 120

109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	
324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	
369	414	414	414	414	414	369	369	414	414	369	414	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
1					1	1	1		1	1	1	Para
0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	
1	1	0	1	1		1	1	1		1		
0		0	0	0			0				0	
1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	
	1			1	1	1		1	1	1		Para
0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 121 a 132

121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	
324	324	324	324	324	324	324	358	358	358	358	358	
369	414	414	414	414	414	414	448	448	448	448	403	
1							1	1	1	1	1	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
1	0	0	0	0	0	0					0	
0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
		1			1		1				1	Para
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	
0	0		0	1	0	0		0	0	1	1	

Columnas 133 a 144

133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	
358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	
448	448	448	448	448	448	403	403	448	403	448	403	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
				1	1	1	1	1	1	1	1	Para
1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	
0	0	1	1			1			1		1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
				1	1	1	1					Para
1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
0	1	0	1				1	0	0	1	0	

Columnas 145 a 156

145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	
358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	
403	448	448	403	448	403	448	448	448	403	358	448	

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
1					-	-	-	1	1	1	1
0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
1	0	1	0	1	1	1	1			1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1
0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
1			1		1	0	1		1	1	0

Columnas 157 a 168

157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358
448	403	448	403	403	448	448	448	448	403	448	403
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
	1		1	1	0	1	1	1	1	-	1
		0	0	0				0			
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	1				1	1	1		1	1	1
1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Columnas 169 a 180

169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
358	392	392	392	392	392	392	392	392	392	392	392
448	482	437	482	437	482	437	437	482	482	482	482
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
0		1		1	-	1	1	1	1	1	-
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1						1			1
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1
0			0	0	1	0	1	-	0	1	1

Columnas 181 a 192

181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
392	392	392	392	392	392	392	392	392	392	392	392
437	437	437	392	437	437	482	437	482	437	437	437
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1			1	1	1	1
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
1		1	1	1	1	1	1	-	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1	1	1	1			1	1	1	1	1	
0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
	1		1	0	1	-	1	0	0	0	0

Columnas 193 a 204

193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
392	426	426	426	426	426	426	426	426	426	426	426
482	516	471	471	426	471	471	471	516	516	471	426
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1
1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
1		1	-	1	1	1	1	-	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	1
1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
0			1	1	0	1	1	1	1		1

Columnas 205 a 210

205	206	207	208	209	210	
426	460	460	460	494	154	
471	505	460	505	494	244	
1	1	1	1	1	0	
1	1	1	1	1	0	
1	1	1	1	1	-	Para
1	1	1	1	1	0	
1	1	1	1	1	0	
	1	1	1	1	0	
1	1	1	1	1	0	
1	1	1		1		Para
1	1	0	1	1	0	
0		1	1	1	0	

Rendimiento de la Nitración: de los 209 isómeros el 78 % son di-nitrados, el 27 % son mono-nitrados y el 3 % no se nitra debido a que las posiciones se encuentran ocupadas por átomos de cloro.

Aroclor® 1016.-

Fila 1 = Número de Isómero según IUPAC,

Fila 2 = Masa de PCB,

Fila 3 = Masa de PCB nitrado,

Filas 4-14 = Posiciones nitradas (2)

Columnas 1 a 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	14
188	188	188	222	222	222	222	222	222	222	222	222
278	278	278	312	312	312	312	312	312	312	312	312
1	0		1	1	1	1	1	1	-	0	0
0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
		1	-	-	-	1	-	-	1	-	-
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Columnas 13 a 24

15	16	17	18	19	20	22	25	26	27	28	31
222	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
312	346	346	346	346	346	346	346	346	346	346	346
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
1		1	-	-	-	-	1	-	-	1	-
0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
0	0	-	0	1	0	0	-	0	1	-	0
	1	1	1	1	0	0	0	0	0		
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
1						1	-	-	-	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Columnas 25 a 36

32	33	35	37	39	40	41	43	44	45	46	47
256	256	256	256	256	290	290	290	290	290	290	290
346	346	346	346	346	380	380	380	380	380	380	380
1				0	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	1	1	1			1					1
0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
	1	0			1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1			1	1	-	-	-	-	-	-	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

Columnas 37 a 48

48	49	52	53	54	66	74	75	88	92	95	98
290	290	290	290	290	290	290	290	324	324	324	324
380	380	380	380	380	380	380	335	369	414	414	369
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1	1	-	-	-	1	1	1	1	1	-	1
1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
		0	0	1			1	1	0	1	1
1	1	1	1	1			1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
		-	-	-	1	1	1	-	-	-	-
0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Columnas 49 a 51

108	113	210
324	324	154
414	414	244
1	1	0
1	1	0
1		
0	0	0
-	1	0
0	0	0
1	1	0
1	1	0
0	0	0

Para

Para

Rendimiento de la Nitración: De los 51 isómeros el 95 % son di-nitrados y el 5 % restante son mono-nitrados

Aroclor® 1242.-

Fila 1 = Número de Isómero según IUPAC,

Fila 2 = Masa de PCB,

Fila 3 = Masa de PCB nitrado,

Filas 4-10 = Posiciones nitradas (2)

Columnas 1 a 12

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
188	188	188	222	222	222	222	222	222	222	222	222
278	278	278	312	312	312	312	312	312	312	312	312
1	0		1	1	1	1	1	1	1	0	
0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	Para
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
0	0	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	Para
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 13 a 24

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
222	222	222	256	256	256	256	256	256	256	256	256	
312	312	312	346	346	346	346	346	346	346	346	346	
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
		1		1	-	-	-	1	-	-	-	Para
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
		0	1	1	1	1	0	0	-	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1		1							1			Para
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 25 a 36

25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	
346	346	346	346	346	301	346	346	346	346	346	346	
1	1	1	1	1	1	1	1	-	0	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
1		-	1	1	1	-	-	1	-	1		Para
0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	
		0	1		1	0	1	0	0	0	0	
0	0	0		0	0	-	-	1	1	0	0	
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
		-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	Para
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 37 a 48

37	38	39	40	41	43	44	45	46	47	48	49	
256	256	256	290	290	290	290	290	290	290	290	290	
346	346	346	380	380	380	380	380	380	380	380	380	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1			1	-	-	-	-	1	1	1	Para
0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
0	0	0	0	0	0	0	1	0				
		0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	-	1	-	-	-	-	-	-	1			Para
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	1		0	0	

Columnas 49 a 60

50	51	52	53	54	56	60	66	70	72	74	75	
290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	
335	380	380	380	380	380	380	380	380	380	380	335	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	Para
0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	
1		0	0	1	0			0	0		1	
1	1	1	1	1	-	-	-		0			
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	
		-	-	-	1	1	1	1	-	1	1	Para

0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Columnas 61 a 72

77	78	79	81	84	85	87	92	95	98	99	101	
290	290	290	290	324	324	324	324	324	324	324	324	
380	380	380	380	414	414	414	414	414	369	414	414	
-	-	0	-	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
1	1	-	1	-	1	1	-	-	1	1	1	Para
0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	
0	0	0	0	1	-	-	0	1	1	-	-	
-	0	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	
1	1	1	1	-	1	-	-	-	-	1	-	Para
0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 73 a 84

105	108	113	120	121	122	123	126	127	138	143	153	
324	324	324	324	324	324	324	324	324	358	358	358	
414	414	414	414	369	414	414	414	414	448	448	448	
1	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	1	
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	
1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	
-	0	1	1	0	0	0	0	0	-	-	-	
-	0	0	0	0	1	1	-	0	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	
1	1	-	-	-	-	1	1	-	1	-	1	Para
0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	
0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	1	-	

Column 85

210
154
244
0
0
Para
0
0
0
0
Para
0
0

Rendimiento de la Nitración: De los 85 isómeros el 95 % son di-nitrados y el 5 % restante son mono-nitrados

Aroclor® 1248.-

- Fila 1 = Número de Isómero según IUPAC,**
- Fila 2 = Masa de PCB,**
- Fila 3 = Masa de PCB nitrado,**
- Filas 4-10 = Posiciones nitradas (2)**

Columnas 1 a 12

4	6	8	16	17	18	22	26	31	32	37	40
222	222	222	256	256	256	256	256	256	256	256	290
312	312	312	346	346	346	346	346	346	346	346	380
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
				1						1	
0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	-	0	0	0	0	1	0	0
1	0	-	1	1	1	-	0	-	-	-	1
0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
		1				1		1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Para

Para

Columnas 13 a 24

42	45	47	49	52	53	55	56	66	70	71	72
290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290
380	380	380	380	380	380	380	380	380	380	380	380
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
		1	1			1		1			
0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
0	1	-	-	0	0	-	0	-	0	1	0
1	1	1	1	1	1	0	-	-	-	-	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1		1					1	1	1	1	
0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
	0		0	0	1	0	0	0	0	0	0

Para

Para

Columnas 25 a 36

73	74	77	79	84	85	86	87	91	92	97	99
290	290	290	290	324	324	324	324	324	324	324	324
380	380	380	380	414	414	414	414	414	414	414	414
1	1		0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	1	1	-	-	1	1	1	-	-	1	1
0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
1		0	0	1	-	-	-	1	0		
0		-	-	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
	1	1	1	1	1			1			1
1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0
0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	0	

Para

Para

Columnas 37 a 48

101	110	113	121	133	134	135	136	138	148	149	153
324	324	324	324	358	358	358	358	358	358	358	358
414	414	414	369	448	448	448	448	448	403	448	448
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
1			1	-	-	-	-	1	-	-	1
1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
	1	1	1	0	0	1	1	-	0	1	
1		0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	1	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	1	0	1		1		

Para

Para

Columnas 49 a 51

168	171	176
358	392	392
403	437	437
1	1	1
0	1	1
1	1	1
0	0	0

Para

1	1	1	
	1	1	
1	1	1	
1	1		Para
1	0	0	
0		1	

Rendimiento de la Nitración: De los 51 isómeros el 90 % son di-nitrados y el 10 % restante son mono-nitrados

Aroclor® 1254.-

Fila 1 = Número de Isómero según IUPAC,

Fila 2 = Masa de PCB,

Fila 3 = Masa de PCB nitrado,

Filas 4-10 = Posiciones nitradas (2)

Columnas 1 a 12

6	18	31	37	40	42	45	47	49	52	53	55	
222	256	256	256	290	290	290	290	290	290	290	290	
312	346	346	346	380	380	380	380	380	380	380	380	
1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	
-	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	1	Para
0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
0	0	0	0	0	0	1	-	-	0	0	-	
0	1			1	1	1	1	1	1	1	0	
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	
		1	1		1	-	1	-	-	-	-	Para
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
0	0	0	0	0		0		0	0	1	0	

Columnas 13 a 24

56	66	70	72	74	76	77	79	83	84	85	86	
290	290	290	290	290	290	290	290	324	324	324	324	
380	380	380	380	380	380	380	380	414	414	414	414	
1	1	1	1	1	-	-	0	1	1	1	1	
1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
	1			1	1	1				1	1	Para
0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
0		0	0	-	0	0	0	0	1	-		
			0		1			1	1	1	1	
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	
1	1	1		1		1	1	-		1		Para
0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 25 a 36

87	91	92	97	99	101	106	110	114	118	120	121	
324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	
414	414	414	414	414	414	414	414	414	414	414	369	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	
1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	
	1	0			-	-	1				1	
1	1	1	1	1	1	0				0	0	
0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	
	1			1	-	-	1	1	1	-	-	Para
1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	
0		0	0		0	0	0	0	0	0	0	

Columnas 37 a 48

125	126	128	131	132	133	134	135	136	138	148	149	
324	324	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	
414	414	448	448	403	448	448	448	448	448	403	448	
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	Para
1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	
0	0		0	0	0	0	1	1	1	0	1	
1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
	1	1	-	1	-	-	-	-	1	1	1	Para
0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	
1	0		1	1	0	1	0	1		1		

Columnas 49 a 60

151	153	154	157	158	159	167	168	170	171	179	180	
358	358	358	358	358	358	358	358	392	392	392	392	
448	448	403	448	403	448	448	403	482	437	482	482	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	Para
1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
1				1	-	-	1	-	1	1	1	
1	1	1		-	0	-	-	1	1	1	1	
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	1	Para
1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	
0		1	0	0	0	0	0	-		1		

Columnas 61 a 67

181	183	185	187	192	193	198						
392	392	392	392	392	392	426						
437	437	437	482	437	482	471						
1	1	1	1	1	1	1						
1	1	1	1	1	1	1						
1	1	1	1	1	-	1		Para				
1	0	1	1	1	1	1						
1	1	1	1	1	1	1						
1	1	1	1	1	0	-						
0	0	0	0	1	1	1						
1	1	-	1	-	1	-		Para				
0	1	1	1	1	1	1						
		0		0	0	0						

Rendimiento de la Nitración: De los 67 isómeros el 82 % son di-nitrados y el 18 % restante son mono-nitrados

Aroclor® 1260.-

Fila 1 = Número de Isómero según IUPAC,

Fila 2 = Masa de PCB,

Fila 3 = Masa de PCB nitrado,

Filas 4-10 = Posiciones nitradas (2)

Columnas 1 a 12

37	40	42	47	49	52	55	66	70	72	74	76
256	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290
346	380	380	380	380	380	380	380	380	380	380	380
-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1	-	-	1	1	-	1	1	-	-	1	1
0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	-	-	0	-	-	0	0	-	0
0	1	1	1	1	1	0	-	-	0	-	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0

Para

Para

Columnas 13 a 24

83	84	85	86	87	91	97	99	101	106	110	113
324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324	324
414	414	414	414	414	414	414	414	414	414	414	414
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	-	-
1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
0	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	-	0
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-
0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	0	0

Para

Para

Columnas 25 a 36

114	118	120	121	124	126	128	131	132	133	134	136
324	324	324	324	324	324	358	358	358	358	358	358
414	414	414	369	414	414	448	448	403	448	448	448
1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-
1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
-	-	0	1	0	0	-	-	0	0	0	1
0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-
0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	-	1	1	0	1	1

Para

Para

Columnas 37 a 48

138	149	151	153	156	157	158	159	167	168	169	170
358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	358	392
448	448	448	448	448	448	403	448	448	403	448	482
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	0	-
1	1	1	1	-	-	0	-	-	-	-	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0

Para

Para

0 0 0 0 0 0 0 0

Columnas 49 a 60

174	176	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	
392	392	392	392	392	392	392	392	392	392	392	392	
482	437	482	482	437	437	437	392	437	437	482	437	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	
1	1	1			1		1	0	1		1	

Columnas 61 a 72

189	190	194	196	197	198	199	200	201	202	203	204	
392	392	426	426	426	426	426	426	426	426	426	426	
482	437	516	471	426	471	471	471	516	516	471	426	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Para
1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	
0	0		1	1	0	1	1	1	1		1	

Columnas 73 a 77

205	206	207	208	209	
426	460	460	460	494	
471	505	460	505	494	
1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	Para
1	1	1	1	1	
	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	
1	1	1		1	Para
1	1	0	1	1	
0		1	1	1	

Rendimiento de la Nitración: De los 77 isómeros el 67 % son di-nitrados y el 26 % son mono-nitrados y el 7 % no se nitra debido a que las posiciones se encuentran ocupadas por átomos de cloro.

‡ **Fichero que introduce los distintos isómeros de PCB en la matriz pcb**

```

pcb=zeros(10,210);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% MONOCLORADOS %%%%%%%%%
pcb(1,1)=1;
pcb(2,2)=1;
pcb(3,3)=1;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% DICLORADOS %%%%%%%%%
pcb([1,6],4)=ones(2,1);
pcb([1,2],5)=ones(2,1);
pcb([1,7],6)=ones(2,1);
pcb([1,3],7)=ones(2,1);
pcb([1,8],8)=ones(2,1);
pcb([1,4],9)=ones(2,1);
pcb([1,5],10)=ones(2,1);
pcb([2,7],11)=ones(2,1);
pcb([2,3],12)=ones(2,1);
pcb([2,8],13)=ones(2,1);
pcb([2,9],14)=ones(2,1);
pcb([3,8],15)=ones(2,1);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% TRICLORADOS %%%%%%%%%
pcb([1,6,2],16)=ones(3,1);
pcb([1,6,3],17)=ones(3,1);
pcb([1,6,4],18)=ones(3,1);
pcb([1,6,5],19)=ones(3,1);
pcb([1,2,7],20)=ones(3,1);
pcb([1,2,3],21)=ones(3,1);
pcb([1,2,8],22)=ones(3,1);
pcb([1,2,4],23)=ones(3,1);
pcb([1,2,5],24)=ones(3,1);
pcb([1,7,3],25)=ones(3,1);
pcb([1,7,4],26)=ones(3,1);
pcb([1,7,5],27)=ones(3,1);
pcb([1,3,8],28)=ones(3,1);
pcb([1,3,4],29)=ones(3,1);
pcb([1,3,5],30)=ones(3,1);
pcb([1,8,4],31)=ones(3,1);
pcb([1,8,5],32)=ones(3,1);
pcb([6,2,3],33)=ones(3,1);
pcb([6,2,4],34)=ones(3,1);
pcb([2,7,3],35)=ones(3,1);
pcb([2,7,4],36)=ones(3,1);
pcb([2,3,8],37)=ones(3,1);
pcb([2,3,4],38)=ones(3,1);
pcb([2,8,4],39)=ones(3,1);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%% TETRACLORADOS %%%%%%%%%
pcb([1,6,2,7],40)=ones(4,1);
pcb([1,6,2,3],41)=ones(4,1);
pcb([1,6,2,8],42)=ones(4,1);
pcb([1,6,2,4],43)=ones(4,1);
pcb([1,6,2,9],44)=ones(4,1);
pcb([1,6,2,5],45)=ones(4,1);
pcb([1,6,2,10],46)=ones(4,1);
pcb([1,6,3,8],47)=ones(4,1);
pcb([1,6,3,4],48)=ones(4,1);
pcb([1,6,3,9],49)=ones(4,1);
pcb([1,6,3,5],50)=ones(4,1);
pcb([1,6,3,10],51)=ones(4,1);
pcb([1,6,4,9],52)=ones(4,1);
pcb([1,6,4,10],53)=ones(4,1);
pcb([1,6,5,10],54)=ones(4,1);
pcb([1,2,7,3],55)=ones(4,1);
pcb([1,2,7,8],56)=ones(4,1);
pcb([1,2,7,4],57)=ones(4,1);
pcb([1,2,7,9],58)=ones(4,1);
pcb([1,2,7,5],59)=ones(4,1);
pcb([1,2,3,8],60)=ones(4,1);
pcb([1,2,3,4],61)=ones(4,1);
pcb([1,2,3,5],62)=ones(4,1);
pcb([1,2,8,4],63)=ones(4,1);
pcb([1,2,8,5],64)=ones(4,1);

```

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

```

pcb([1,2,4,5],65)=ones(4,1);
pcb([1,7,3,8],66)=ones(4,1);
pcb([1,7,3,4],67)=ones(4,1);
pcb([1,7,3,9],68)=ones(4,1);
pcb([1,7,3,5],69)=ones(4,1);
pcb([1,7,8,4],70)=ones(4,1);
pcb([1,7,8,5],71)=ones(4,1);
pcb([1,7,4,9],72)=ones(4,1);
pcb([1,7,9,5],73)=ones(4,1);
pcb([1,3,8,4],74)=ones(4,1);
pcb([1,3,8,5],75)=ones(4,1);
pcb([6,2,3,4],76)=ones(4,1);
pcb([2,7,3,8],77)=ones(4,1);
pcb([2,7,3,9],78)=ones(4,1);
pcb([2,7,8,9],79)=ones(4,1);
pcb([2,7,4,9],80)=ones(4,1);
pcb([2,3,8,4],81)=ones(4,1);

```

***** PENTAFLORADOS *****

```

pcb([1,6,2,7,3],82)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,7,4],83)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,7,5],84)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,3,8],85)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,3,4],86)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,3,9],87)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,3,5],88)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,3,10],89)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,8,4],90)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,8,5],91)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,4,9],92)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,4,5],93)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,4,10],94)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,9,5],95)=ones(5,1);
pcb([1,6,2,5,10],96)=ones(5,1);
pcb([1,6,7,3,4],97)=ones(5,1);
pcb([1,6,7,3,5],98)=ones(5,1);
pcb([1,6,3,8,4],99)=ones(5,1);
pcb([1,6,3,8,5],100)=ones(5,1);
pcb([1,6,3,4,9],101)=ones(5,1);
pcb([1,6,3,4,10],102)=ones(5,1);
pcb([1,6,3,9,5],103)=ones(5,1);
pcb([1,6,3,5,10],104)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,3,8],105)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,3,4],106)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,8,4],107)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,3,9],108)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,3,5],109)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,8,5],110)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,4,9],111)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,4,5],112)=ones(5,1);
pcb([1,2,7,9,5],113)=ones(5,1);
pcb([1,2,3,8,4],114)=ones(5,1);
pcb([1,2,3,8,5],115)=ones(5,1);
pcb([1,2,3,4,5],116)=ones(5,1);
pcb([1,2,8,4,5],117)=ones(5,1);
pcb([1,7,3,8,4],118)=ones(5,1);
pcb([1,7,3,8,5],119)=ones(5,1);
pcb([1,7,3,4,9],120)=ones(5,1);
pcb([1,7,3,9,5],121)=ones(5,1);
pcb([6,2,7,3,4],122)=ones(5,1);
pcb([6,2,3,8,4],123)=ones(5,1);
pcb([6,2,3,4,9],124)=ones(5,1);
pcb([6,2,3,4,10],125)=ones(5,1);
pcb([2,7,3,8,4],126)=ones(5,1);
pcb([2,7,3,4,9],127)=ones(5,1);

```

***** HEXAFLORADOS *****

```

pcb([1,6,2,7,3,8],128)=ones(6,1);
pcb([1,6,2,7,3,4],129)=ones(6,1);
pcb([1,6,2,7,3,9],130)=ones(6,1);
pcb([1,6,2,7,3,10],131)=ones(6,1);
pcb([1,6,2,7,8,10],132)=ones(6,1);
pcb([1,6,2,7,4,9],133)=ones(6,1);

```

```

pcb({1,6,2,7,4,10},134)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,7,4,5},135)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,7,5,10},136)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,8,4},137)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,8,9},138)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,8,5},139)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,8,10},140)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,4,9},141)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,4,5},142)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,4,10},143)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,9,5},144)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,3,5,10},145)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,8,4,9},146)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,8,4,5},147)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,8,4,10},148)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,8,9,5},149)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,8,5,10},150)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,4,9,5},151)=ones(6,1);
pcb({1,6,2,4,5,10},152)=ones(6,1);
pcb({1,6,3,8,4,9},153)=ones(6,1);
pcb({1,6,3,8,4,10},154)=ones(6,1);
pcb({1,6,3,8,5,10},155)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,3,8,4},156)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,3,8,9},157)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,3,8,5},158)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,3,4,9},159)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,3,4,5},160)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,3,9,5},161)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,8,4,9},162)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,8,4,5},163)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,8,9,5},164)=ones(6,1);
pcb({1,2,7,4,9,5},165)=ones(6,1);
pcb({1,2,3,8,4,5},166)=ones(6,1);
pcb({1,7,3,8,4,9},167)=ones(6,1);
pcb({1,7,3,8,9,5},168)=ones(6,1);
pcb({2,7,3,8,4,9},169)=ones(6,1);
*****HEPTACLORADOS *****
pcb({1,6,2,7,3,8,4},170)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,3,8,5},171)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,3,4,9},172)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,3,4,5},173)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,3,4,10},174)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,3,9,5},175)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,3,5,10},176)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,8,4,5},177)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,4,9,5},178)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,7,4,5,10},179)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,3,8,4,9},180)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,3,8,4,5},181)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,3,8,4,10},182)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,3,8,9,5},183)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,3,8,5,10},184)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,3,4,9,5},185)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,3,4,5,10},186)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,8,4,9,5},187)=ones(7,1);
pcb({1,6,2,8,4,5,10},188)=ones(7,1);
pcb({1,2,7,3,8,4,9},189)=ones(7,1);
pcb({1,2,7,3,8,4,5},190)=ones(7,1);
pcb({1,2,7,3,8,9,5},191)=ones(7,1);
pcb({1,2,7,3,4,9,5},192)=ones(7,1);
pcb({1,2,7,8,4,9,5},193)=ones(7,1);
*****OCTACLORADOS *****
pcb({1,6,2,7,3,8,4,9},194)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,3,8,4,5},195)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,3,8,9,10},196)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,3,8,5,10},197)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,3,4,9,5},198)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,3,4,5,10},199)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,3,9,5,10},200)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,3,4,9,10},201)=ones(8,1);
pcb({1,6,2,7,4,9,5,10},202)=ones(8,1);

```

```

pcb([1,6,2,3,8,4,9,5],203)=ones(8,1);
pcb([1,6,2,3,8,4,5,10],204)=ones(8,1);
pcb([1,2,7,3,8,4,9,5],205)=ones(8,1);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
pcb([1,6,2,7,3,8,4,9,5],206)=ones(9,1);
pcb([1,6,2,7,3,8,4,5,10],207)=ones(9,1);
pcb([1,6,2,7,3,4,9,5,10],208)=ones(9,1);
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
pcb([1,2,3,4,5,6,7,8,9,10],209)=ones(10,1);
function aro1016=ar1016(pcb)

```

```

% Función que separa las columnas de la matriz argumento
% que forman parte del Aroclor® 1016

```

```

aro1016=pcb(:,1:9);
aro1016=[aro1016,pcb(:,12:20)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,22)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,25:28)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,31:33)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,35)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,37)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,39)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,40:41)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,43:48)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,49)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,52)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,53)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,54)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,66)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,74)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,75)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,88)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,92)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,95)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,98)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,108)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,113)];
aro1016=[aro1016,pcb(:,210)];

```

```
function aro1242=ar1242(pcbnitra)
```

```

% Función que separa la matriz según los Aroclor® 1242

```

```

echo off
aro1242=0;
aro1242=pcbnitra(:,1:41);
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,43:54)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,56)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,60)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,66)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,70)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,72)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,74)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,75)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,77:79)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,81)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,84)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,85)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,87)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,92)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,95)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,98)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,99)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,101)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,105)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,108)];
aro1242=[aro1242,pcbnitra(:,113)];

```

```

arol242=[arol242,pcbnitra(:,120:123)];
arol242=[arol242,pcbnitra(:,126)];
arol242=[arol242,pcbnitra(:,127)];
arol242=[arol242,pcbnitra(:,138)];
arol242=[arol242,pcbnitra(:,143)];
arol242=[arol242,pcbnitra(:,153)];
arol242=[arol242,pcbnitra(:,210)];

```

```
function arol248=ar1248(pcb)
```

```

% Función que separa las columnas de la matriz argumento
% que pertenecen al Aroclor® 1248

```

```

arol248=pcb(:, [4,6,8]);
arol248=[arol248,pcb(:,16:18)];
arol248=[arol248,pcb(:, [22,26,31,32,37,40,42,45,47,49,52,53,55,56,66])];
arol248=[arol248,pcb(:,70:74)];
arol248=[arol248,pcb(:, [77,79])];
arol248=[arol248,pcb(:,84:87)];
arol248=[arol248,pcb(:, [91,92,97,99,101,110,113,121])];
arol248=[arol248,pcb(:,133:136)];
arol248=[arol248,pcb(:, [138,148,149,153,168,171,176])];

```

```
function arol254=ar1254(pcbnitra)
```

```

%% Esta función selecciona las columnas de la matriz
% que pertenecen al aroclor 1254.

```

```

arol254=pcbnitra(:,6);
arol254=[arol254,pcbnitra(:,18)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,31)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,37)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,40)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,42)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,45)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,47)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,49)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,52)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,53)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,55)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,56)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,66)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,70)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,72)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,74)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,76)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,77)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,79)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,83:87)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,91)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,92)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,97)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,99)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,101)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,106)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,110)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,114)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,118)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,120)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,121)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,125)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,126)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,128)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,131)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,132:136)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,138)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,148)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,149)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,151)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,153)];

```

```

arol254=[arol254,pcbnitra(:,154)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,157:159)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,167)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,168)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,170)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,171)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,179:181)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,183)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,185)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,187)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,192)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,193)];
arol254=[arol254,pcbnitra(:,198)];
function arol260=ar1260(pcb)

```

```

% Función que separa las columnas de la matriz argumento
% que pertenecen al Aroclor® 1260

```

```

arol260=pcb(:, [37,40,42,47,49,52,55,66,70,72,74,76]);
arol260=[arol260,pcb(:,83:87)];
arol260=[arol260,pcb(:, [91,97,99,101,106,110,113,114,118,120,121,124])];
arol260=[arol260,pcb(:, [126,128,131,132,133,134,136,138,149,151,153])];
arol260=[arol260,pcb(:,156:159)];
arol260=[arol260,pcb(:,167:170)];
arol260=[arol260,pcb(:,174)];
arol260=[arol260,pcb(:,176)];
arol260=[arol260,pcb(:,179:190)];
arol260=[arol260,pcb(:,194)];
arol260=[arol260,pcb(:,196:209)];

```

Function pcbnitra=nitra(pcb)

```

% Función que calcula la manera de nitrarse los distintos isómeros de PCB
recibe como variable la matriz pcb y devuelve una matriz con la nitración
marcada como un dos en la posición adecuada

```

```

echo off
for iso=pcb,
    if iso(3)==0
        iso(3)=2;
    elseif iso(1)==0
        iso(1)=2;
    elseif iso(5)==0
        iso(5)=2;
    end;
    if iso(8)==0
        iso(8)=2;
    elseif iso(6)==0
        iso(6)=2;
    elseif iso(10)==0
        iso(10)=2;
    end;
    pcbnitra=[pcbnitra,iso];
end;

```

```

function [di,mono,no]=cuentani(pcb)

```

```

% Cuenta la nitración

```

```

echo off
di=0;
mono=0;
no=0;
for iso=pcb,
    nitra=0;
    for cont=1:10,
        if iso(cont)==2

```

```
        nitra=nitra+1;
    end;
end;
if nitra==0
    no=no+1;
elseif nitra==1
    mono=mono+1;
elseif nitra==2
    di=di+1;
else
    error('No funciona');
end;
end

function masas=masapcb(pcb)

% Función que calcula las masas moleculares de los distintos
% isómeros de PCB Nitrados
echo off
for iso=pcb,
    masa=12*12;
    for cont=1:10,
        if iso(cont)==0
            masa=masa+1;
        elseif iso(cont)==1
            masa=masa+35;
        elseif iso(cont)==2
            masa=masa+46;
        end;
    end;
    masas=[masas;masa];
end;
```