



DEGRADACIÓN DEL FENOL EN AGUAS RESIDUALES DE BAÑOS QUÍMICOS PORTÁTILES DEL SECTOR CONSTRUCCIÓN MEDIANTE

Pseudomonas aeruginosa

PHENOL DEGRADATION IN PORTABLE CHEMICAL BATHS WASTE OF THE CONSTRUCTION SECTOR BY *Pseudomonas aeruginosa*

Luis Alberto Supo Quispe¹, Sandra Beatriz Butrón Pinazo¹

¹Universidad Nacional del Altiplano, Av. floral N° 1153, Puno, Perú, ingluisalberto83@gmail.com

RESUMEN

Las aguas residuales de baños portátiles son consideradas aguas residuales industriales debido a la alta carga contaminante, entre los principales y más tóxicos se encuentran los compuestos fenólicos que hacen que sea necesario y obligatorio el tratamiento adecuado antes de verterlo en los sistemas de alcantarillado. La investigación fue realizada en la empresa Concretos Supermix S.A. durante los meses de Junio a Diciembre del 2019. Tuvo como objetivo, evaluar la degradación del fenol de aguas residuales de baños químicos portátiles mediante *Pseudomonas aeruginosa*. Se obtuvieron las cepas microbianas a partir de muestras de aguas residuales provenientes de baños químicos portátiles, el crecimiento de bacterias se realizó en medios de cultivos generales y selectivos. La inmovilización se realizó por atrapamiento de bacterias, en una matriz de alginato de calcio. La adaptación fue de forma gradual con incrementos de dosificación de fenol en concentraciones de 7 a 1400 mg/L, en medio mineral (20 %) con 10 % de cultivo de cepas, en un periodo de 72 a 168 h, se emplearon 310 perlas de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizadas, con tiempos de contacto de 168 h para concentraciones iniciales de 368 mg/L de fenol, obteniendo como concentración final de 91,4 mg/L (porcentaje de remoción de 75,2 %) y para las 3 muestras de 5 mg/L de fenol, se emplearon 125 perlas, con tiempos de contacto de 96 h, obteniendo como concentración final 0,34; ,18 y 0,21 mg/L (porcentaje de remoción de 93,2; 96,4; 95,8 %). Se concluye que *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada tiene capacidad para degradar fenol.

Palabras clave: Agua residual, baño químico, biodegradación, fenol, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

Wastewater from portable toilets is considered industrial waste water due to the high pollutant load, among the main and most toxic are the phenolic compounds that make proper treatment necessary and mandatory before discharge into sewage systems. The research was carried out in Concretos Supermix S.A company. Its objective was to evaluate the phenol degradation in wastewater from portable chemical toilets by *Pseudomonas aeruginosa*. The microbial strains were obtained beginning with wastewater samples from portable chemical toilets, the bacteria growth was carried out in general and selective culture media. Immobilization was carried out by trapping bacteria, in a calcium alginate matrix. The adaptation was gradual with increases in phenol dosage in concentrations from 7 to 1400 mg/L, in mineral medium (20 %) with 10 % of strain culture, in a period of 72 to 168 h, 310 immobilized *Pseudomonas aeruginosa* beads were used, with contact times of 168 h for initial concentrations of 368 mg/L of phenol, obtaining a final concentration of 91.4 mg/L (removal percentage of 75.2 %) and for the 3 samples of 5 mg/L of phenol, 125 beads were used, with contact times of 96 h, obtaining a final concentration of 0.34; 0.18 and 0.21 mg/L (removal percentage of 93.2; 96.4; 95.8 %). It is concluded that immobilized *Pseudomonas aeruginosa* has the ability to degrade phenol.

Keywords: Waste water, chemical bath, biodegradation, phenol, *Pseudomonas aeruginosa*.

*Autor para correspondencia: ingluisalberto83@gmail.com



INTRODUCCIÓN

El fenol y sus derivados son la unidad estructural básica en una amplia variedad de compuestos orgánicos sintéticos (Annadurai *et al.* 2002). Es un compuesto aromático orgánico que ocurre naturalmente en el medio ambiente (Prpich & Daugulis 2005), pero se produce más comúnmente artificialmente a partir de actividades industriales como el procesamiento de petróleo, la fabricación de plásticos, la producción de resina, la producción de pesticidas, la fabricación de acero y la producción de pinturas y barnices (Kumari *et al.* 2013; Bandyopadhyay *et al.* 1998).

Este compuesto aromático es soluble en agua y altamente móvil (Collins & Daugulis 1999) y, como tal, las aguas residuales generadas a partir de estas actividades industriales que contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos (Chang *et al.* 2001) que eventualmente pueden llegar a arroyos, ríos, lagos y tierra, lo que representa un grave problema ecológico debido a su uso generalizado y su presencia en todo el medio ambiente (Zilli *et al.* 2007). El fenol es un contaminante prioritario de la lista de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA 2014) y la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades, lo considera un compuesto tóxico (ATSDR 2018). Los efectos adversos del fenol en la salud están bien documentados (Calabrese & Kenyon, 2018) y se ha informado de la muerte entre adultos con la ingestión de fenol en un rango de 1 a 32 g (Prpich & Daugulis 2005).

La baja volatilidad del fenol y su afinidad por el agua hacen que el consumo oral de agua contaminada sea el mayor riesgo para humanos (Prpich & Daugulis 2005). Se ha utilizado una variedad de técnicas para la eliminación de fenol de efluentes industriales y aguas contaminadas, y la bioremediación recibe la mayor atención debido a su capacidad para el medio ambiente, su capacidad para mineralizar completamente compuestos orgánicos tóxicos y de bajo costo (Odokuma & Okpokwasili 1993).

La degradación microbiana del fenol se ha estudiado activamente y estos estudios han demostrado que el fenol puede ser degradado aeróbicamente por una amplia variedad de cultivos de hongos y bacterias como *Candida tropicalis* (Ruiz-Ordaz *et al.* 2001), *Acinetobacter calcoaceticus* (Oboirien *et al.* 2017), *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas putida* y *Burkholderia cepacia G4* (Hill & Robinson 1975). Se ha demostrado que el tratamiento de pequeños volúmenes de compuestos tóxicos en el punto de emisión utilizando cepas microbianas específicas y mejores biorreactores permite un mayor control sobre el proceso y mayores eficiencias de eliminación (Kotturi *et al.* 1991). Por lo tanto, se reconoce que la optimización de las variables del proceso es un aspecto esencial de la fermentación exitosa (Ruiz-Ordaz *et al.* 2001). La alta dependencia de la actividad enzimática y los requisitos de mantenimiento celular de la temperatura hacen que sea una cantidad importante.

La temperatura ejerce una importante influencia reguladora sobre la tasa de metabolismo (Ghosh

& Swaminathan 2003). Los efectos del suministro de oxígeno varían de una especie a otra (Xu *et al.* 2016). Además, la transferencia de masa de oxígeno se ve favorecida por las tasas de agitación que crean las turbulencias y las fuerzas de corte en el sistema de cultivo causan influencias significativas en la tasa de crecimiento y la formación del producto (Hoq & Deckwer 1995); este trabajo examina el efecto de la temperatura, la aireación y la agitación en la degradación del fenol por las cepas locales de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando tanto el método clásico de optimización que implica variar el nivel de un parámetro a la vez en un cierto rango mientras se mantiene el resto de Las variables constante y técnica de optimización estadística para efecto multivariable.

Los objetivos del presente trabajo de investigación son aislar bacterias con capacidad degradativa de fenol, adaptar la bacteria aislada a diferentes concentraciones crecientes de fenol y evaluar la capacidad de biodegradación de la bacteria inmovilizada en una matriz de alginato de calcio.

MÉTODOS

Ámbito o lugar de estudio

La investigación fue realizada en la planta de la empresa Concretos Supermix S.A.; donde la empresa Ecovida Grupo Inmobiliario S.A.C., en su obra “Construcción de Infraestructura en Nueva Planta Caracoto – Concretos Supermix” viene realizando una obra de construcción. En la ejecución de esta obra se contrató los

servicios de baños químicos portátiles para uso de trabajadores, los que fueron objeto de estudio. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Humana.

Descripción de métodos

Aislamiento de bacterias con capacidad degradativa de fenol

Para el aislamiento de bacterias, se desarrollaron dos clases de siembra y por duplicado cada una para las muestras, el primero compuesto por; agua del baño químico del lugar; el segundo compuesto por; agua una vez utilizado el baño químico. El crecimiento de bacterias se realizó en medio de cultivo agar Tripticasa de soya, en medio selectivo agar MacConkey y agar Cetrimide (Koneman & Allen 2008). Se tomó una muestra de las colonias de bacterias de las placas Petri con agar TSA y se realizaron repiques en agar MacConkey y agar Cetrimide y se incubaron a 37 °C por 24 - 72 horas, para obtener cultivos puros (Koneman & Allen 2008), se realizó la tinción de Gram con la finalidad de observar la morfología característica de *Pseudomonas aeruginosa* (Koneman & Allen 2008). Para obtener las lecturas finales y de confirmación, se utilizó el kit de pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CITRATO, UREA) y finalmente se hizo una lectura con las tablas de comparación para identificar a *Pseudomonas aeruginosa*. Para validar la identificación de la cepa aislada, se trasladó la muestra a las instalaciones del

hospital ESSALUD de Salcedo y con el equipo WalkAway 96 Plus se sometió a una última prueba para comprobar y validar la cepa bacteriana.

Adaptación de la bacteria aislada a diferentes concentraciones crecientes de fenol

Se utilizó medio mineral como técnica de enriquecimiento en medio líquido que a sido el medio de Fatherpure y Vogel, empleado para el aislamiento de microorganismos que se encontraran en aguas residuales, con una modificación por conveniencia, macronutriente (mg/L) en agua desionizada: K_2HPO_4 , 900; KH_2PO_4 , 450; NH_4Cl , 450; $NaCl$, 900; $MgSO_4$, 210; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 20; $FeCl_2$, 5.0, fuente de carbono y energía: extracto de levadura, 1 mg/L (Fatherpure & Vogel 2015). De las cepas identificadas, se hicieron ensayos de adaptación de 7 a 1400 mg/L de concentración de fenol, se tuvo un Cultivo Primario donde se sembraron las cepas identificadas en 5 mL de caldo nutritivo. En cada fiola de 50 mL, se colocaron 5mL del cultivo bacteriano seguidamente se adicionaron 10 mL de medio mineral (medio mineral modificado de Fatherpure y Vogel) y 35 mL de la solución acuosa de 7 mg/L de fenol (solución previamente autoclavada), seguidamente se incubaron a 37 °C por 72 horas. Finalmente, se traspasó a tubos Falcon que se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min, la precipitación celular de cada tubo Falcon se colectó para los siguientes ensayos experimentales (Fatherpure & Vogel 2015) y para el Cultivo Secundario, se utilize fiolas y en

cada fiola de 50mL, se adicionó 5mL del cultivo primario (células precipitadas), a este se le incorporó 10 mL de medio mineral, y 35 mL de solución de 35 mg/L fenol, seguidamente se incubaron a 37 °C por 72 horas. Finalmente, se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min. Los ensayos experimentales posteriores se continuaron con el procedimiento mencionado, con adiciones de concentraciones de 70, 350, y 700 mg/L de fenol, se incubaron a 37 °C por 72 horas para cada uno; y para concentraciones adicionales de 1050 y 1400 mg/L de fenol, se incubaron a 37 °C por 168 horas para cada uno (Fatherpure & Vogel 2015), finalmente del último ensayo se tomó una alícuota de 1 mL de cada muestra y se realizó diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} para las siembras bacteriológicas en agar nutritivo, con el método de recuento en placa.

Evaluación de la capacidad de biodegradación de la bacteria inmovilizada en una matriz de alginato de calcio

La inmovilización de los microorganismos se realizó por atrapamiento de bacterias, durante la formación de la matriz de alginato de calcio. La cepa seleccionada se resembró en caldo nutritivo para su utilización (Chang *et al.* 2001). En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se disolvió 2.4 gr. de ácido algínico (2,4 % w/v) con 100 mL de medio mineral modificado de Fatherpure y Vogel, seguidamente se esterilizó. A esta solución se le agregó 1.5 mL de la cepa seleccionada, luego se agitó el matraz hasta su completa homogenización (Chang *et al.* 2001). La solución homogénea se transfirió a una

micropipeta, y se dejó gotear la solución algínica con bacterias en 100 mL de cloruro de calcio (al 2,4 %, de pH 6,0) previamente esterilizada. La altura de la caída de la gota fue de 5 cm, para la formación de la perla. Finalmente, fueron lavadas con 100 mL de agua destilada para remover el exceso de iones de

calcio (se lavaron 2 veces, cada uno por 20 minutos).

Como el valor de $t = 96,871$ es mayor a $t_{\alpha} = 4,303$ a un nivel de significancia del 5 % se demuestra que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* tiene en la capacidad degradativa frente al fenol (Tabla 1).

Tabla 1. Prueba de hipótesis unilateral de la diferencia pareada antes y después del efecto de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en la capacidad degradativa frente al fenol.

Diferencia	Media \bar{d}	Desviación estándar s_d	Grados de libertad	t	t_{α}
Antes-Después	4,75667	0,08505	2	96,871	4,303

La inmovilización de los microorganismos se realizó por atrapamiento de bacterias, durante la formación de la matriz de alginato de calcio y la cepa seleccionada se resembró en caldo nutritivo para su utilización (Chang *et al.* 2001)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias con capacidad degradativa de fenol

Los resultados obtenidos de las pruebas de reconocimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* por medio de ensayos de tinción gram, medios de cultivo y pruebas bioquímicas

descritas en la tabla 9 y 10, se observaron que poseen características de ser Gram negativa, crecieron en el medio TSA con pigmentación amarilla, en medio MacConkey con coloración rosada y en Agar Cetrimide, con características físicas morfológicas con forma circular con elevación plano de superficie lisa y brillante, y de consistencia mucosa. Utilizaron al citrato como fuente de carbono (Citrato de Simmons positivo), crecieron en medio LIA por lo que son sideróforo, no fermentaron lactosa, sacarosa, glucosa (resultado de TSI negativo), no sintetizaron la urea (resultado de UREA negativo) (Figura 1).

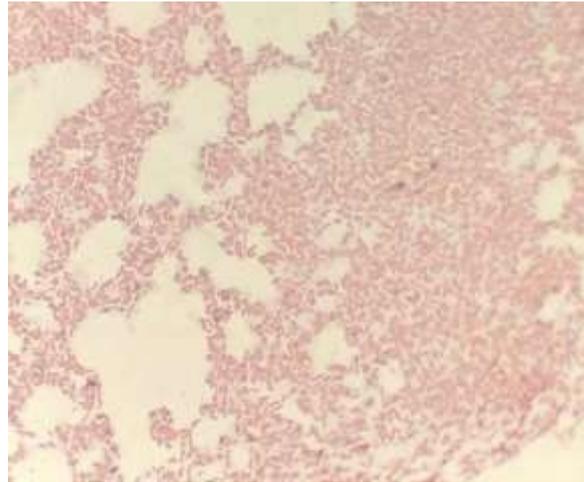


Figura 1. Tinción de Gram: bacilos gramnegativos.

El aislamiento coincidió con Rivera *et al.* (2008), quienes emplearon el medio agar cetrimide, coloración Gram y las pruebas de oxidasa y del citrato para el aislamiento e identificación de *P. aeruginosa*.

Por otro lado la caracterización concuerda con lo reportado por Ruiz (2007); Ortíz *et al.* (2004) quienes describen a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de ser bacilos Gram negativo, que se presentan amarillo-verdoso por la producción de pioverdina, se considera como sideróforo pertenece al grupo heterogéneo denominado no fermentadores, descarboxilan Llisina hasta CO₂ y H₂O vía cadaverina, Revellés *et al.* (2005) con morfología colonial alargada y plana, con el centro elevado, de crecimiento en medio sólido

con producción de mucoide como consecuencia de sobreproducción de alginato.

Adaptación de la bacteria aislada a diferentes concentraciones crecientes de fenol

La adaptación de bacterias se desarrolló de forma gradual con incrementos de dosificación de fenol químicamente puro en concentraciones de 7, 35, 70, 350, 700, 1050, y 1400 mg/L, en medio mineral de Fatherpure y Vogel (20 %) con 10 % de cultivo de cepas, en un periodo de 24 a 168 horas (1-7 días). El número de colonias crecidas en placas de medio agar nutritivo, nos permitió observar el crecimiento de la bacteria en las diferentes concentraciones de fenol, se fue observando cada día por un lapso de 7 días y así se evidenció su adaptación (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de fenol final (llevada al límite) pasados 120 horas.

Temperatura (°C)	pH	N° Perlas	Nombre de muestra llevada al laboratorio	Concentración de fenol despues de utilizar la bacteria (mg/L)
14	7,1	310	M1	91,4

Los resultados coinciden con lo que argumenta Prieto *et al.* (2002) el uso de bacterias puras para procesos de bioremediación y su adaptación a concentraciones de la sustancia a estudiar, como en el caso de fenol, y donde los procesos aeróbicos u oxigénicos son relevantes (Zhou *et al.* 2011), así como la pre adaptación que aumenta eficiencia (Kwon & Yeom 2009).

Evaluación de la capacidad de biodegradación de la bacteria inmovilizada en una matriz de alginato de calcio

Con el propósito de obtener resultados de la degradación del fenol presente en aguas residuales por medio de *Pseudomonas aeruginosa*, se desarrolló la parte experimental de la remoción del fenol, en un estanque de vidrio de 3,5 L de capacidad y en 4 matraces de 1000 ml, se aplicó células de *Pseudomonas*

aeruginosa inmovilizadas en matrices de alginato de calcio, se empleó 30,10 g. de geles de alginato de calcio equivalente a 310 perlas con diámetro de 0.3 cm, en muestras de 1 L con aireación constante de 220 - 240 V a temperatura ambiente con tiempos de contacto de 168 h para concentraciones iniciales de 368 mg/L de fenol (concentración alta) obteniendo como concentración final de 91,4 mg/L (porcentaje de remoción de 75,2 %) y para las 3 muestras de 5 mg/L de fenol (concentración real), se empleó 10,03 g. de geles de alginato de calcio equivalente a 125 perlas con diámetro de 0,3 cm, en muestras de 1 L con aireación constante de 220 - 240 V a temperatura ambiente con tiempos de contacto de 96 h, obteniendo como concentración final 0,34; 0.18 y 0,21 mg/L (porcentaje de remoción de 93,2; 96,4; 95,8 % respectivamente) (Tabla 3).

Tabla 3.1 Concentración de fenol final pasados 72 horas.

Temperatura (°C)	pH	N° Perlas	Nombre de muestra llevada al laboratorio	Concentración de fenol después de utilizar la bacteria (mg/L)
14	4,9	125	MP1-1	0,34
15	5,2	125	MP1-2	0,18
15	5,1	125	MP1-3	0,21

La reducción de la concentración de fenol utilizando *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizada en geles de alginato de calcio coincide con lo que Mollaei *et al.* (2010) menciona en su trabajo, la inmovilización protege las células contra el fenol y resulta en una reducción notable (65 %) en el tiempo de

degradación por las células inmovilizadas en perlas de alginato (3 %), en perlas híbridas de PVA-alginato o en cápsulas de ACA en comparación con las células suspendidas libremente. Las células inmovilizadas en PVA-alginato y ACA proporcionaron el mejor rendimiento en experimentos con

concentraciones elevadas de fenol, hasta 2000 mg / L, con una degradación completa de 2000 mg / L de fenol después de 100 y 110 h, respectivamente.

El análisis sobre el efecto positivo de matriz ha sido estudiado por Ullhyan & Ghosh (2012) afirmando que el incremento del inóculo libre o inmovilizado incrementa el porcentaje de remoción, por su parte Yordanova *et al.* (2013) plantea que las células aclimatadas e inmovilizadas reducen más rápido la concentración del fenol, en conclusión, la cantidad de inóculo libre o inmovilizado tiene efecto positivo en la degradación del fenol Leilei *et al.* (2012), lo citado concuerda con los porcentajes de remoción alcanzados, donde para la primera concentración (llevada al límite) se obtuvo un porcentaje de remoción del 75,2 % y para las demás concentraciones, porcentajes de remoción de 93,2; 96,4 y 95,8 %.

La temperatura ejerce una importante influencia reguladora sobre la tasa de metabolismo (Ghosh & Swaminathan 2003). Los efectos del suministro de oxígeno varían de una especie a otra (Xu *et al.* 2016). Además, la transferencia de masa de oxígeno se ve favorecida por las tasas de agitación que crean las turbulencias y las fuerzas de corte en el sistema de cultivo causan influencias significativas en la tasa de crecimiento y la formación del producto (Hoq & Deckwer 1995), lo que concuerda con la investigación realizada, donde la temperatura se mantuvo en un rango entre 14 y 15 °C

(temperatura ambiente) y con aireación constante de 220 - 240 V.

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento primario en el medio de cultivo Agar Trypticase Soya (TSA), se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas siendo consideradas muestras positivas. La adaptación de bacterias se desarrolló de forma gradual con incrementos de dosificación de fenol químicamente puro en concentraciones de 7, 35, 70, 350, 700, 1050, y 1400 mg/L, en medio mineral de Fatherpure y Vogel (20%) con 10% de cultivo de cepas, en un periodo de 72 a 168 horas (3-7 días). Los resultados de la biodegradación de fenol, con concentraciones iniciales de 368 y 5 mg/L de fenol por medio de *Pseudomonas aeruginosa* inmovilizados en geles de alginato de calcio, se obtuvieron concentraciones finales de 91,4, 0,34, 0,18 y 0,21 mg/L de fenol con remociones del 75,2, 93,2, 96,4 y 95,8 %, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano y a la Escuela de Postgrado, ofreciéndome más que un recinto de estudios. A mi esposa Sandra y a mi hijo Stephano Gerard por el apoyo que me brindaron, por todos estos años que confiaron en mí, comprendiendo mis ideales y la lucha por mis sueños.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores de iniciales (LASP) (SBBP), no tiene conflictos de ninguna índole.

REFERENCIAS

- Annadurai, G., Juang, R. S., & Lee, D. J. 2002. Microbiological degradation of phenol using mixed liquors of *Pseudomonas putida* and activated sludge. *Waste Management*, 22(7), 703–710. [https://doi.org/10.1016/S0956-053X\(02\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0956-053X(02)00050-8)
- ATSDR. 2018. *Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades - Compuestos tóxicos peligrosos*. EEUU. <https://www.atsdr.cdc.gov/es/index.html>
- Bandyopadhyay, D., Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., & Kumar, R. 1998. Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1568–1573. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1568>
- Calabrese, E. J., & Kenyon, E. 2018. *Air toxics and risk assessment* (5th ed.). EEUU: CRC Press. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=-jvDgIht9QC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Calabrese+%26+Kenyon,+2014+-+Air+toxics+and+risk+assessment&ots=uUQ7wcoWE0&sig=tgjAyFkFy-PtfAaHc1stsTqSIDI#v=onepage&q=Calabrese+%26+Kenyon%2C+2014+-Air+toxics+and+risk+assessment&f>
- Chang, J. S., Chou, C., & Chen, S. Y. 2001. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry*, 36(8–9), 757–763. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00274-0)
- Collins, L. D., & Daugulis, A. J. 1999. Benzene/toluene/p-xylene degradation. Part I. Solvent selection and toluene degradation in a two-phase partitioning bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(3), 354–359. <https://doi.org/10.1007/s002530051531>
- EPA Agency, U. S. E. P. 2014. *Quality Assurance Guidance Document-Model Quality Assurance Project Plan for the PM Ambient Air*. EEUU. <https://www.epa.gov/environmental-topics/water-topics>
- Fathepure, B. Z., & Vogel, T. M. 2015. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3418–3422. <https://doi.org/10.1128/aem.57.12.3418-3422.1991>
- Ghosh, S., & Swaminathan, T. 2003. Optimization of process variables for the extractive fermentation of 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca* in aqueous two-phase system using response surface methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 17(4), 319–325. <http://silverstripe.fkit.hr/cabecq/assets/Uploads/Cabecq-2003-04-09.pdf>
- Hill, G. A., & Robinson, C. W. 1975. Substrate inhibition kinetics: Phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(11), 1599–1615. <https://doi.org/10.1002/bit.260171105>
- Hoq, M. M., & Deckwer, W. D. 1995. Cellulase-free xylanase by thermophilic fungi: a comparison of xylanase production by two *Thermomyces lanuginosus* strains. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 43(4), 604–609. <https://doi.org/10.1007/BF00164761>
- Koneman, E. W., & Allen, S. oneman, and S. A. 2008. *Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. (Ed. médica). Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=jyVQueKro88C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Koneman+%26+Allen,+2008&ots=5PNg08aPoz&sig=sn9B8d113X2p81cGpK0ALPOMEV4#v=onepage&q=Koneman%26Allen%2C2008&f=false>
- Kotturi, G., Robinson, C. W., & Inniss, W. E. 1991. Applied Microbiology Biotechnology Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 539–543. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00180585>
- Kumari, S., Chetty, D., Ramdhani, N., & Bux, F. 2013. Phenol degrading ability of *Rhodococcus pyridivorans* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from activated sludge plants in South Africa. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 48(8), 947–953. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.762740>
- Kwon, K. H., & Yeom, S. H. 2009. Optimal microbial adaptation routes for the rapid degradation of high concentration of phenol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(4), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0263-z>
- Leilei, Z., Mingxin, H., & Suiyi, Z. 2012. Biodegradation of p-nitrophenol by immobilized *Rhodococcus* sp. strain Y-1. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 26(2), 137–144. https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=124933
- Mollaei, M., Abdollahpour, S., Atashgahi, S., Abbasi, H., Masoomi, F., Rad, I., ... Noghabi, K. A. 2010. Enhanced phenol degradation by *Pseudomonas* sp. SA01: Gaining insight into the novel single and hybrid immobilizations. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1–3), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.002>
- Oboirien, B. O., Amigun, B., Ojumu, T. V., Ogunkunle, O. A., Adetunji, O. A., Betiku, E., & Solomon, B. O. 2017. Parametros Para Varias De Degradacion Del Fenol Pseudomanos Improtnate.Pdf. <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/biotech/2005/56-61.pdf>.
- Odokuma, L. O., & Okpokwasili, G. C. 1993. Seasonal ecology of hydrocarbon-utilizing microbes in the surface Waters of a river. *Environmental Monitoring and Assessment*, 27(3), 175–191. <https://doi.org/10.1007/BF00548364>
- Prieto, M. B., Hidalgo, A., Serra, J. L., & Llama, M. J. 2002. Degradation of phenol by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized on Biolite® in a packed-bed reactor. *Journal of Biotechnology*, 97(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00022-6)
- Prpich, G. P., & Daugulis, A. J. 2005. Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid two phase partitioning bioreactor. *Biodegradation*, 16(4), 329–339. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-2036-y>
- Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., & Huayán-Dávila, G. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasa clásica y de espectro extendido en reservorios de un servicio de

- Neonatología. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, 25(2), 250–252. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2008.252.1263>
- Ruiz-Ordaz, N., Ruiz-Lagunez, J. C., Castañón-González, J. H., Hernández-Manzano, E., Cristiani-Urbina, E., & Galíndez-Mayer, J. 2001. Phenol biodegradation using a repeated batch culture of *Candida tropicalis* in a multistage bubble column. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(1), 19–25. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=10554>
- Ullhyan, A., & Ghosh, U. K. 2012. Biodegradation of phenol with immobilized *Pseudomonas putida* activated carbon packed bio-filter tower. *African Journal of Biotechnology*, 11(85), 15160–15167. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3620>
- Xu, R. X., Li, B., Zhang, Y., Si, L., Zhang, X. Q., & Xie, B. 2016. Response of biodegradation characteristics of unacclimated activated sludge to moderate pressure in a batch reactor. *Chemosphere*, 148, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.018>
- Yordanova, G., Godjevargova, T., Nenkova, R., & Ivanova, D. 2013. Biodegradation of phenol and phenolic derivatives by a mixture of immobilized cells of *Aspergillus awamori* and *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(2), 3681–3688. <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2013.0003>
- Zhou, J., Yu, X., Ding, C., Wang, Z., Zhou, Q., Pao, H., & Cai, W. 2011. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. *Journal of Environmental Sciences*, 23(1), 22–30. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60369-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60369-5)
- Zilli, M., Converti, A., Fava, F., & Nicoletta, C. 2007. Control of 2-chlorophenol vapour emissions by a trickling biofilter. *Journal of Biotechnology*, 128(3), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.014>