

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Desempeño de reactores de lecho fluidizado acoplados
a filtros abióticos ante incrementos sustanciales de PCE”**

Tesis que presenta

M. en C. Luz de María Bretón Deval

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo

México, D.F.

Diciembre 2015

Esta Tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo, en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y de Energías Renovables (GBAER) del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Luz de María Bretón Deval agradece a CONACYT por la beca 233432 otorgada para el desarrollo de esta investigación

México D.F. Diciembre 2015

Comité Tutorial

Director

Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo

CINVESTAV-IPN

Depto. de Biotecnología y Bioingeniería

Grupo de Biotecnología Ambiental y de Energías Renovables

Asesora

Dra. Josefina Barrera Cortés

CINVESTAV-IPN

Depto. de Biotecnología y Bioingeniería

Control Inteligente de Bioprocesos

Asesor

Dr. Juvencio Galíndez Mayer

ENCB-IPN

Depto. Ingeniería Bioquímica

Bioingeniería

Asesora

Dra. Katy Juárez López

UNAM-IBT

Regulación de genes relevantes

Asesora

Dra. Teresa Ponce Noyola

CINVESTAV-IPN

Depto. de Biotecnología y Bioingeniería

Bioprocesos y Bioproductos

Asesora Extraordinaria

Q.F.B. Elvira Ríos Leal

CINVESTAV-IPN

Depto. de Biotecnología y Bioingeniería

Central Analítica

Asesor

Dr. Omar Solorza Feria

CINVESTAV-IPN

Depto. de Química

Electroquímica y Celdas

Nuestras horas son minutos cuando
esperamos saber, y siglos cuando
sabemos lo que se puede aprender

Antonio Machado

Índice

1	Introducción y Antecedentes	1
	1.1. El PCE en el ambiente	1
	1.2 Efectos en la salud provocados por el PCE	2
	1.3 Tratamiento de agua contaminada con PCE	2
	1.3.1 Biorremediación	3
	1.4 El uso de tensoactivos para aumentar la solubilidad del PCE	4
	1.5 Microorganismos degradadores de PCE	6
	1.5.1 Herramientas moleculares para la identificación de microorganismos	8
	1.6 Reactores de lecho fluidizado	10
	1.7 Tecnología abiótica para el tratamiento de PCE	12
	1.7.1 Partículas de hierro para la remoción de PCE	13
	1.7.2 Nanopartículas de hierro	13
2	Justificación	16
3	Hipótesis	17
4	Objetivos	18
5	Metodología	19
	5.1 Estrategia de Trabajo	19
	5.2. Operación de reactores de lecho fluidizado con incrementos en la concentración de percloroetileno	20
	5.3. Degradación de tween 80 por el consorcio de los reactores de lecho fluidizado: efecto del aceptor de electrones	24
	5.4. Degradación de percloroetileno asistida por nanopartículas: experimentos preliminares	25
	5.5. Degradación de percloroetileno con nanopartículas bimetálicas Fe/Pd	26
	5.6. Nanomembrana de Fe para la remoción de percloroetileno	29
	5.7. Bionano-biopartículas de magnetita para la remoción de percloroetileno	30
6	Resultado y Discusión	32
	6.1 Remoción de percloroetileno en los reactores de lecho fluidizado	32
	6.2 Degradación de tween 80 por el consorcio de los reactores de lecho fluidizado: efecto del aceptor de electrones	46
	6.3 Degradación de percloroetileno asistida por nanopartículas	52
7	Conclusiones	76
8	Bibliografía	77
	Anexos	84

Lista de Tablas

Tabla 1	Solubilización de PCE con los tensoactivos Tween 80, DSS, y UH..	6
Tabla 2	Plan de seguimiento de los biorreactores de lecho fluidizado	21
Tabla 3	Alimentación de los reactores a lo largo de todos los periodos	23
Tabla 4	Variables de respuesta para los reactores de lecho fluidizado	23
Tabla 5	Concentración de PCE y metabolitos a lo largo de los periodos	33
Tabla 6	Balance de cloro orgánico de los reactores	34
Tabla 7	Secuencias encontradas en los biorreactores	38
Tabla 8	Remoción de PCE y metabolitos encontrados en los periodos	40
Tabla 9	Abundancia relativa de los microorganismos en los reactores	45
Tabla 10	Parámetros fisicoquímicos tomados de la degradación del Tween 80 bajo diversos aceptores de electrones	47
Tabla 11	Energía libre de Gibbs de la degradación de glucosa	49
Tabla 12	Metabolitos producto de la degradación de PCE en las NPs	52
Tabla 13	Tasas de remoción de PCE con nanopartículas de Fe/Pd	57

Lista de Figuras

Figura 1	Estructura química del PCE	1
Figura 2	Percloroetileno absorbido en un acuífero	3
Figura 3	Tensoactivos	5
Figura 4	Deshalogenación reductiva de los cloroetilenos	7
Figura 5	Reactor metanogénico de lecho fluidizado	11
Figura 6	Patrón de difracción para un policristal de hierro	15
Figura 7	Estrategia de trabajo	19
Figura 8	Reactores de lecho fluidizado	20
Figura 9	Etapas de los reactores de lecho fluidizado	22
Figura 10	Concentraciones de cloro orgánico absorbidas	35
Figura 11	Dinámica de PCE y metabolitos	36
Figura 12	Periodo de aclimatación de las biopartículas al PCE	37
Figura 13	Imagen de gel de electroforesis de TGGE	39
Figura 14	Copias de genes DHC encontrados en los bioreactores	41
Figura 15	Población microbiana de los reactores de lecho fluidizado	44
Figura 16	Dinámica de los ácidos grasos del Tween 80	51
Figura 17	La eficiencia de remoción de PCE en las nanopartículas	53
Figura 18	Dinámica de la remoción del PCE por las nanopartículas	53
Figura 19	Espectro de energía dispersa (EDS) de las NPs en FP1	55
Figura 20	Dinámica de la concentración de PCE	56
Figura 21	Concentración de PCE y metabolitos	58
Figura 22	Costos estimados de la síntesis de las NPs Fe/Pd	59
Figura 23	Eficiencia de PCE removido por medio de la nano-membrana de hierro	60
Figura 24	Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la nano membrana de hierro	61
Figura 25	Espectro de energía dispersiva (EDS) de la nano-membrana	62
Figura 26	Patrón de rayos X (XRD) de la nano membrana	63
Figura 27	Composición de la nano membrana de hierro	63
Figura 28	Imágenes TEM de la nano membrana	64
Figura 29	Imágenes SEM de la nano-membrana	65
Figura 30	Comparación remoción de PCE entre las nano-membranas	66
Figura 31	Remoción de PCE en el reactor con filtro nanoparticulado	68
Figura 32	Dinámica de la remoción de PCE en el reactor con filtro nano	69
Figura 33	Patrón de Rayos X (XRD) de los tratamientos 0.15 M	70
Figura 34	Patrón de Rayos X (XRD) de las bionano- biopartículas	71
Figura 35	Composición de las bio nano biopartículas	71
Figura 36	Imágenes SEM de las bio nano	72
Figura 37	Espectro de energía dispersiva (EDS) de las bio nano	73
Figura 38	Remoción de PCE por las bio nano biopartículas	74
Figura 39	Imágenes TEM de las bio nano	75
Figura 40	Análisis de espectroscopía electrónica de pérdidas de energía (EELs) de las bio nano después de remover PCE	75

Notación

Ab	aerobio
BET	isoterma de Brunauer Emmett Teller
BTEX	benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
CM	carboxi metil celulosa
CMC	concentración micelar critica
CV	cloruro de vinilo
DCE	dicloroetileno
DHC	Dehalococcoides
DN	desnitrificante
DNAPL	fase liquida no acuosa
DQO	demanda química de oxígeno
EDS	detector de energía dispersiva
EELS	espectro de perdida de energía
EPA	agencia de protección al medio ambiente de USA
FISH	hibridación in situ con fluorescencia
HFBB	reactores de lecho fluidizado hibrido
HLB	equilibrio hidrófilo lipofílico
Km	PCE en las micelas del tensoactivo y que va al PCE en solución
M	metanogénico
MFBB	reactor de lecho fluidizado con filtro ZVI/arena
NP	nanopartícula
PCE	percloroetileno
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RLF	reactores de lecho fluidizado
RSM	relación de solubilidad molar
SDS	sodio dodecil sulfato
SEM	microscopio electrónico de barrido
SMA	actividad metanogénica especifica
SumFa	sumatoria de los ácidos
TBAB	tetra-n- butilamonio de bromuro
TBAB	tetra-n-butylammonium bromide
TCE	tricloroetileno
TGGE	electroforesis en gel con gradiente de temperatura
XRD	difracción de rayos X
ZVI	hierro cero

Resumen

El percloroetileno (PCE) es uno de los compuestos clorados más utilizados en la industria de la limpieza. Sin embargo es un contaminante nocivo para la salud que puede alterar el sistema inmune, hepático, linfático entre otros. La remoción de este compuesto se lleva a cabo más eficientemente de forma anaerobia y es necesario seguir desarrollando nuevas tecnologías que permitan la eficiente remoción de este compuesto.

El objetivo de esta investigación consistió en (i) Evaluar el desempeño del reactores de lecho fluidizado a altas concentraciones de PCE, acoplados a filtros de hierro (ii) Determinar la mejor herramienta abiótica para acoplar a la biorremediación de los reactores, y (iii) evaluar la remoción del tensoactivo Tween 80.

El sistema presentó remociones elevadas del contaminante en todos los periodos (>90%), después de que los microorganismos se aclimataron a la concentración de PCE. En los últimos dos periodos se necesitaron mayores días de aclimatación debido a las altas concentraciones del contaminante. La presión selectiva de las altas concentraciones de PCE en los microorganismos probablemente ayudo a que el consorcio se hiciera rico en bacterias deshalogenadoras como *Dehalobacter spp.*, *Desulfurospirillum spp.*, *Desulfitobacterium spp.*, *Dehalococcoides spp.* y *Methanosarcina spp.* Los reactores que tenían acoplado el filtro de hierro y arena presentaron mayor concentración de *Dehalococcoides* y esto es consistente con las remociones mayores de PCE que removió.

La evaluación del tensoactivo, Tween 80, el cual hace más soluble al PCE, probó que es un compuesto que puede ser degradado por el consorcio, sin que cause inhibiciones o retrase el proceso de remoción del contaminante.

Las herramientas abióticas más prometedoras para acoplar al sistema fue la nano- membrana de hierro la cual puede remover el 94% de PCE (90 mg/L) en 10 horas, sin generar metabolitos secundarios.

En conclusión acoplar los filtros de hierro a los reactores de lecho fluidizado genero mayor remoción de PCE además de una reducción de los metabolitos secundarios. Hasta lo que tenemos conocimiento esta es la primera vez que se ha trabajado con concentraciones tan altas de PCE (393 mg/L PCE)

Abstract

Perchloroethylene (PCE) is widely used in dry-clean facilities and other industries. However a highly toxic compound that can produce alterations in the immune system, liver and kidneys among other damages.

The objective of this work was: (i) evaluate the effect of coupling a zero-valent side filter to AFBBRRs on performance bioreactors (ii) Determine the best abiotic tool to attach to reactor, (iii) evaluate the degradation of the nonionic surfactant Tween 80, a mixture of fatty acids by the consortium of the bioreactors.

The HFBB removed a higher amount of PCE and presented lower concentrations of metabolites than the MFBB in all four periods of operation. In general, mass of metabolites in the effluents, gas trap (volatilized PCE and metabolites) and sorbed onto bed bioparticles represented less than 5% of the input PCE mass. Average PCE removal efficiencies significantly decreased in the Periods with highest PCE concentrations, for both types of bioreactors. At the end of the process we found a rich consortium in dehalogenating bacteria such as *Dehalobacter spp.*, *Desulfurospirillum spp.*, *Desulfitobacterium spp.*, *Dehalococcoides spp.* and *Methanosarcina spp.*

Tween 80 biodegradation results showed that denitrifying bioreactors had the highest surfactant removal. Indeed, at the end of the batch operation, the remaining concentration was 87 mg COD-SumFA/L, i.e. 70% removal, concluding that Tween 80 could be used as a good carbon source for the consortium.

The best abiotic tools for coupled to the bioreactor was the nano-membrane of iron. The nano membrane of iron can remove 94% of 90 mg/L of PCE in only 10 h without any metabolite.

Coupling zero-valent filters to bioreactors (HFBB) fed with high PCE concentration improved reactor performance (high PCE removal and reduction of concentrations of VC and DCE). To the best of our knowledge, this is the first time that the effective removal of very high concentrations of PCE (95% or higher of nearly 393 mg PCE/L in the water) are reported in an *on site* bioremediation setup.

1-Introducción y antecedentes

1.1 El PCE en el ambiente

El percloroetileno (PCE) cuya estructura química se aprecia en la Figura 1 es el contaminante clorado más encontrado en aguas subterráneas (Albino & Nambi 2009). Este químico es un líquido volátil no inflamable, incoloro que presenta un olor parecido al éter.

Es utilizado principalmente en las tintorerías y en la industria de la limpieza en seco, también en el procesado de productos textiles, el desengrasado de metales, la producción de aerosoles, jabones líquidos, adhesivos, lubricantes y plásticos (Kao *et al.*, 2001).

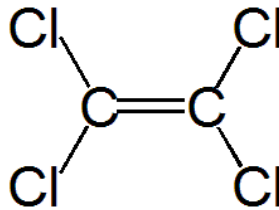


Figura 1. Estructura química del PCE

Debido a que el PCE tiene una solubilidad muy baja, este compuesto no se mezcla con el agua en los acuíferos contaminados (Fig. 2). Por tanto una pequeña porción se disolverá en el agua mientras que la porción que no se disuelva permanecerá como una fase líquida no acuosa (DNAPL) (Moreno *et al.*, 2011).

Las cantidades de este contaminante que se pueden disolver en el agua son muy pequeñas hasta de 110 mg/L pero son suficientes para contaminar gran cantidad de agua. El PCE es un contaminante muy poderoso dado que un kilogramo de PCE puede contaminar 200 millones de litros, al nivel máximo de concentración permitido por la agencia de protección al medio ambiente de USA (EPA, 2003) para el agua potable, que es de 50 ppm (Artiola & Ramírez, 2006).

Además de ser un contaminante muy poderoso también es altamente nocivo para la salud. En países industrializados se han impuesto límites estrechos de exposición. En EEUU y en Canadá el límite máximo permitido para el agua potable es 5 µg/L, en Dinamarca de 3 µg/l y en Suecia es de 2 µg/L (Ortega *et al.*, 2000). En México se comienza a reglamentar este contaminante con la NOM-052-SEMARNAT-1993 la cual establece que el límite máximo permitido en agua potable es de 70 µg/L. sin embargo aún no existe una ley que reglamente la concentración de PCE permitida en agua tratada.

1.2 Efectos en la salud provocados por el PCE

Los seres humanos pueden estar expuestos al PCE y sus metabolitos a través del agua potable, ingesta de alimentos, inhalación, uso de ciertos productos de limpieza o por exposición ocupacional. Algunos estudios sugieren que la absorción cutánea y la inhalación son las principales rutas de exposición (EPA, 2003).

Respirar PCE en pequeñas cantidades puede producir dolores de cabeza, irritación en pulmones, mareo, falta de coordinación y dificultad para concentrarse (EPA 2005). En grandes cantidades este compuesto clorado puede alterar la función del corazón, causar pérdida del conocimiento y la inhalación por largos periodos puede dañar el sistema nervioso, los riñones (ASTDR 2003).

Debido a lo anterior es necesario el continuo desarrollo de tecnologías eficientes que permitan la remoción de este contaminante.

1.3 Tratamiento de Agua contaminada con PCE

El tratamiento de aguas contaminadas con PCE ha sido llevada a cabo con métodos físicos, químicos y biológicos como: oxidación química, métodos térmicos con vapor, adsorción con carbón granular, biorremediación etc. (Moreno-Medina, 2011).

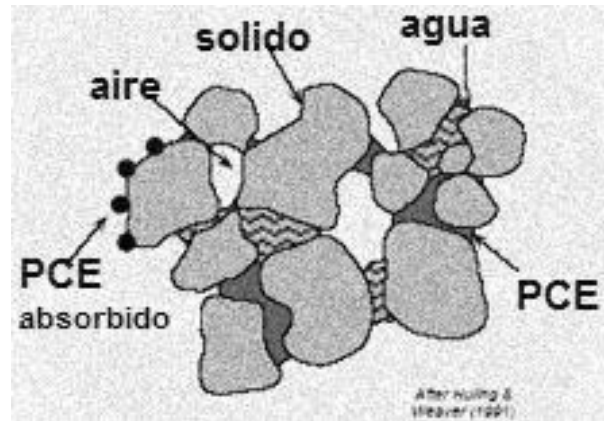


Figura 2. Percloroetileno absorbido en un acuífero

La mayoría de los sitios contaminados necesitan tratamientos robustos que acoplen varias tecnologías, lo que hace a los tratamientos caros y poco amigables con el medio ambiente debido principalmente al gasto energético requerido (Liang *et al.*, 2010). La sustentabilidad de los tratamientos se mide en la generación de impactos secundarios al medio ambiente, cantidad de metabolitos producidos, el gasto energético empleado, materiales usados durante el proceso y el tiempo que duro el tratamiento (Megharaj *et al.*, 2011).

1.3.1 Biorremediación

Algunos estudios demuestran que la biorremediación es una de las herramientas más eficientes y con menor demanda energética para el tratamiento de PCE. El proceso de biorremediación depende del potencial metabólico de los microorganismos para detoxificar o transformar la molécula del contaminante (Antizar-Ladislao, 2010).

La biorremediación generalmente está clasificada como *ex situ* e *in situ*. En esta última se trata al contaminante en el sitio mientras que la *ex situ* requiere que el contaminante sea removido y tratado fuera. La biorremediación *In situ* es un proceso principalmente para contaminantes orgánicos, es considerado de bajo costo, requiere de poco mantenimiento, es amigable con el ambiente y energéticamente sustentable (Megharaj *et al.*, 2011).

Los principales procesos en la biorremediación de efluentes con PCE son:

- a) Atenuación Natural: el contaminante es transformado o inmovilizado por la microbiota presente en el sitio. Es importante la geología del lugar para aprovechar el desencadenamiento de reacciones que ayuden la remoción del contaminante (Smets & Pritchard, 2003).
- b) Tratamiento Anaerobio: este contaminante es degradado principalmente por microorganismos anaerobios entonces debe estimularse su crecimiento y para aumentar la eficiencia del proceso puede adicionarse un sustrato orgánico como donador de electrones (Zárate-Segura *et al.*, 2004).
- c) Tratamiento en secuencia anaerobio – aerobio: si bien el PCE es degradado principalmente por microorganismos anaerobios, los metabolitos productos de la degradación del PCE pueden ser removidos por microorganismos aerobios (Lyew *et al.*, 2002).

La biorremediación de PCE presenta algunos puntos débiles como la poca disponibilidad del compuesto a los microorganismos (Fig. 2). Sin embargo se han implementado estrategias para tratar de solucionar estos problemas con excelentes resultados como, el uso de tensoactivos.

1.4 El uso de tensoactivos para aumentar la solubilidad del PCE

Los tensoactivos son moléculas anfipáticas efectivas en la solubilización de componentes hidrofóbicos, actúan reduciendo la tensión interfacial del compuesto y aumentando su concentración en la fase líquida (Hadibarata & Tachibana 2009)

En la actualidad los tensoactivos (Fig. 3) están siendo usados para solubilizar diversos contaminantes con buenos resultados como lo muestran los trabajos de Prak & Pritchard (2002) que adicionaron 0.6 g/L de Tween 80 y lograron una degradación de hasta 2.2 mg/L de un total de 18 mg/L de una mezcla de pirano, fluoranteno y fenantreno.

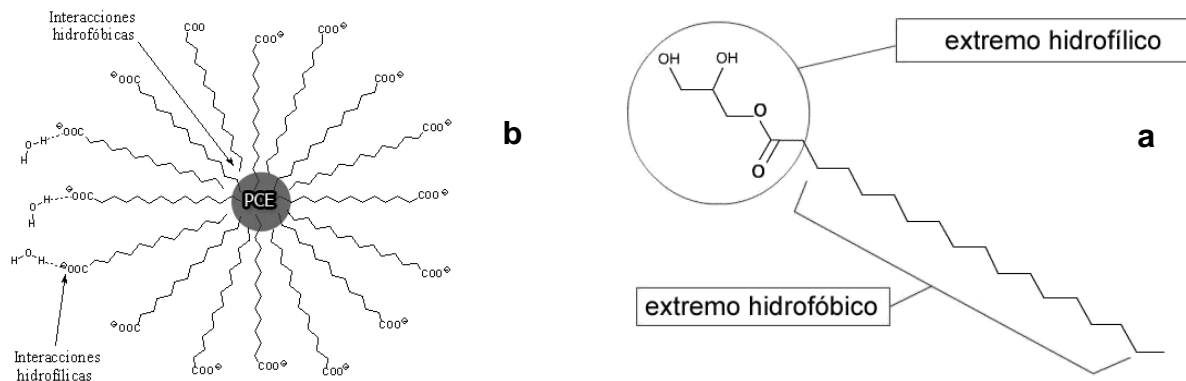


Figura 3. Tensoactivos. Donde el cuadro a muestra las diferentes partes de estas moléculas y el cuadro b como es que los tensoactivos capturan al PCE.

Otro ejemplo del uso de tensoactivos en la solubilidad de compuestos hidrófobos es lo publicado por Lee *et al.*, (2005) que encontraron que la adición de tensoactivos de la serie Tween a suelo y agua contaminada con benceno, tolueno etilbenceno y xileno facilitaba su extracción y posterior remediación al hacer a estos contaminantes de siete a diez veces más solubles. Hadibarata & Tachibana (2009) reportaron que lograron hasta un 86% de degradación de criseno adicionando 0.5% de Tween 80 durante un periodo de 30 días de tratamiento comparando con el 30% de degradación que se obtiene sin la adición del surfactante. Los tensoactivos también están siendo usados para aumentar la degradación de compuestos clorados. Harendra & Vipulanandan (2008) utilizaron 10 g/L del tensoactivo iónico sodio dodecil sulfato (SDS), y lograron solubilizar hasta 1148 mg/L de PCE, once veces más que su solubilidad en agua en un tiempo de 3 horas (Tabla 1)

A pesar de que existen más de 13000 tensoactivos en el mercado, es deseable que el tensoactivo aplicado a la remediación del acuífero no sea volátil, pueda ser reciclado, económico, no sea tóxico, además de que disminuya de forma considerable la tensión superficial del sistema y que posea una baja concentración micelar crítica (CMC) (Lee *et al.*, 2001).

Tabla 1. Solubilización de PCE con los tensoactivos Tween 80, DSS, y UH

Valor/Característica	Tween 80	DSS ^a	UH ^b
CMC ^c (mg/L)	15	2,300	700
Tensión Superficial (dinas/cm) @ 800 mg/L de tensoactivo	37 ± 0.8	35 ± 0.5	28 ± 0.2
PCE solubilizado (mg/L)	1 532 ^d	302 ^d	366 ^d
	---	1 107 ^e	1 148 ^e
K _m ^f (mol PCE/mol tensoactivo)	9.63 ± 0.41	1.53 ± 0.07	2.26 ± 0.10
RSM ^g (mol PCE/mol tensoactivo)	13.79 ± 1.05	0.162 ± 0.014	0.157 ± 0.006
Tasa de solubilización (-)	12.77 ± 0.55	2.52 ± 0.14	3.05 ± 0.16

Notas: ^a dodecil sulfato sódico; ^b biotensoactivo UH; ^c capacidad micelar crítica., ^d la concentración de tensoactivo fue 0.8 g/L; ^e la concentración de tensoactivo fue 10 g/L ^f PCE presente en las micelas del tensoactivo y que va al PCE en solución; ^g relación de solubilidad molar. Los resultados de DSS y UH están adaptados y calculados a partir de lo reportado por Harendra & Vipulanandan (2008).

Los tensoactivos se clasifican de acuerdo a su poder de disociación en presencia de un electrolito y de sus propiedades fisicoquímicas, como cantidad de óxido de etileno, CMC, y equilibrio hidrófilo lipofílico (HLB). Dependiendo de si la parte polar hidrofílica de la molécula lleva carga pueden ser: iónicos o no-iónicos; y dentro de los iónicos según la carga que posea la parte que presenta la actividad de superficie serán: aniónicos, catiónicos y anfotéricos (Shcher-bakova *et al.*, 1999).

Debido a las características de baja CMC, menor toxicidad y estudios previos se ha seleccionado para este estudio al tensoactivo no iónico Tween 80 (Breton-Deval *et al.*, 2015). Este tensoactivo es derivado del monooleato de polioxietileno sorbitol y el ácido oleico sus grupos hidrofílicos son poliéteres. Sus principales características fisicoquímicas se muestran en la Tabla 1.

1.5 Microorganismos degradadores de PCE

El PCE al ser un compuesto altamente recalcitrante es degradado inicialmente por algunos microorganismos anaerobios (Fig. 4) (Holliger & Schumacher, 1998).

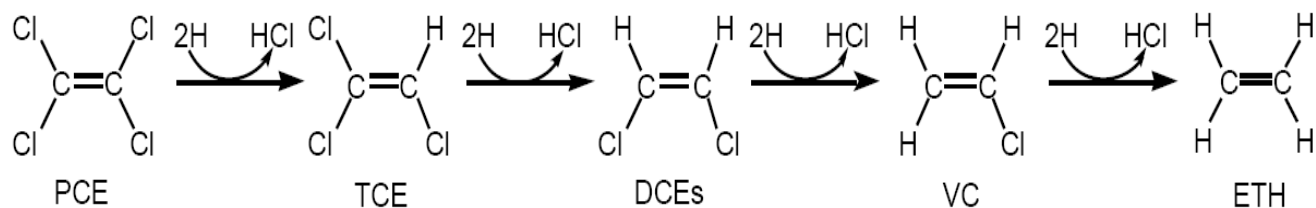


Figura 4. Deshalogenación reductiva de los cloroetilenos. TCE, tricloroetileno; Isómeros de tricloroetileno (representando al *cis*-DCE); VC, cloruro de vinilo o cloroetileno; ETH, etileno; 2H, par de electrones entregados por el donador de electrones. (Tomado de Maymó-Gatell *et al.* (1997).

Si bien se tienen reportes de que microorganismos aerobios pueden participar en la degradación de alguno de los metabolitos productos de la degradación anaerobia del PCE como TCE, DCE O CV, esta degradación es poco eficiente, se lleva a cabo mediante cometabolismo y en presencia de donadores de electrones (Artiola & Ramírez, 2006).

Los microorganismos anaerobios pueden degradar al compuesto mediante cometabolismo mientras que otros lo hacen a través de un proceso de respiración llamado halorespiración (Mohn & Tiedje, 1992). Si la degradación se lleva a cabo mediante cometabolismo el proceso es inespecífico y no está acoplado a la conservación energética de la bacteria, se lleva a cabo mediante reacciones enzimáticas.

Durante la halorespiración el compuesto clorado sirve como aceptor final de electrones durante la oxidación de un compuesto rico en electrones como lo es el hidrógeno o un substrato orgánico (Wang & Wu, 2004). Este proceso consiste en una reacción secuencial en la cual un átomo de cloro es remplazado por un átomo de hidrógeno (Kittelman & Friedrich, 2008). El PCE que contiene cuatro átomos de cloro es primero degradado a TCE después a DEC y VCE como se muestra en la Figura 4.

La mayoría de las veces el TCE es degradado al isómero *cis*-1,2-dicloroeteno (*cis*-DCE) y algunas veces la degradación da como resultado al *trans*-1,2-DCE.

Esto depende de factores como: tipo de sustrato, las condiciones anaeróbicas, la generación de hidrógeno y la población microbiana (Major *et al.*, 2002).

Los microorganismos anaerobios deshalogenadores de PCE (*Desulfito bacterium*, *Dehalobacter restrictus*, *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfuromonas chloroethenica*, *Dehalococcoides ethenogenes* y los anaerobios facultativos *Enterobacter* MS-1 y *Enterobacter agglomerans* (Holliger *et al.*, 1998)) solo pueden degradarlo hasta cis -1,2 dicloroetano. Solo las especies de *Dehalococoides* han sido identificadas como capaces de llevar al PCE a cloruro de vinilo (Yang *et al.*, 2005).

1.5.1 Herramientas moleculares para la identificación de microorganismos en muestras ambientales

Una porción muy pequeña (<1%) de los microorganismos utilizados en la biorremediación son cultivables en laboratorio. Este inconveniente ha mantenido a los consorcios microbianos como cajas negras donde solo era posible conocer sus procesos metabólicos mediante mediciones indirectas (Holliguer *et al.*, 1998).

Las herramientas moleculares proveen una oportunidad única para poder conocer la diversidad de microorganismos que están envueltos en los procesos de biorremediación. Las herramientas moleculares nos arrojan información clave durante todo el proceso de biorremediación, desde la caracterización del sitio, para conocer los microorganismos presentes, hasta el cierre del proyecto, donde se confirman a los microorganismos metabólicamente participantes del proceso de remediación (ITRC, 2011).

Para poder conocer a los microorganismos presentes en nuestro consorcio microbiano primero utilizamos la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

Esta técnica fue introducida en 1993 por Muyzer *et al.* (1998) y permite la separación de fragmentos de ADN de igual tamaño dependiendo de la

composición en bases de los mismos. El fundamento de la técnica se basa en la influencia de la composición de las bases de cada molécula de ADN en la temperatura a la cual dicha molécula se desnaturaliza (temperatura de fusión) La diferencia en el punto de desnaturalización de cada amplificado radica en la cantidad de C – G de la secuencia (Fischer & Lerman, 1980, Muyzer & Smalla, 1998). Además la disminución de la velocidad electroforética de las moléculas de ADN de doble cadena cuando se encuentran parcialmente desnaturalizadas.

Este sistema permite investigar la biodiversidad de poblaciones microbianas complejas, sin necesidad de aislar y estudiar individualmente sus componentes, mediante el aislamiento de un fragmento del gen codificante del ARN 16S (ADNr 16S) de los integrantes de la población objeto de estudio. Es una técnica de elección para la caracterización de poblaciones silvestres, en las que un porcentaje elevado de los microorganismos presentes pueden ser no cultivables.

La técnica es de gran versatilidad y admite numerosas variantes. Es posible obtener mayor información a partir de los patrones de TGGE mediante técnicas de hibridación posteriores, utilizando sondas de oligonucleótidos altamente específicas (Matturro *et al.*, 2013).

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), utiliza sondas que se unen específicamente a determinadas regiones de moléculas de ARNr (Wagner *et al.*, 2003). Además de que también se puede determinar la cantidad de individuos que la muestra tiene. FISH utiliza sondas marcadas con fluorescencia para detectar ARNr 16S dentro de la célula. El grado de conservación de la secuencia marcada por la sonda determina la distancia filogenética del grupo de microorganismos. Pueden diseñarse sondas con dominios específicos para especies, géneros, familias y órdenes (ITRC, 2011).

La principal ventaja de esta técnica comparada con otras técnicas es que se puede determinar directamente la abundancia de los microorganismos detectados. Algunas desventajas de FISH son la ausencia de la señal con sondas específicas cuando realmente están presentes los microorganismos diana, además también

es factible obtener falsos negativos, debido a la impermeabilidad de la sonda provocada por los pasos previos de fijación en la célula.

Otra técnica moderna para determinar los microorganismos presentes en nuestro consorcio es la PCR cuantitativa en tiempo real también llamada qPCR que permite detectar en tiempo real la amplificación del genoma. Para llevar a cabo la detección del fragmento genético se utiliza una sonda (ADN) complementaria a una parte intermedia del ADN que se quiere amplificar (Lebrón *et al.*, 2008).

Esta zona lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (quencher) de tal forma que solo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del quencher y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser (Edgcomb *et al.*, 1999).

La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. Para que la técnica sea válida necesita realizarse en paralelo con una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando (Frischer *et al.*, 2000). Una de sus principales desventajas es la calidad del material de partida. La extracción de ADN es una parte crítica para asegurar información, es por eso que esta técnica no es recomendada para todo tipo de muestra (Haque *et al.*, 2003)

1.6 Reactores de Lecho Fluidizado

Los reactores de lecho fluidizado (RLF) consisten en columnas de vidrio con partículas que fluyen a través del cuerpo del reactor impulsadas por una corriente de flujo (Fig. 5) (Herrera-López., 2007).

Existen varias configuraciones de RLF, la principal diferencia entre los tipos de RLF es su comportamiento hidrodinámico. El comportamiento hidrodinámico es caracterizado por el tipo de operación (batch, semi-continuo o continuo),

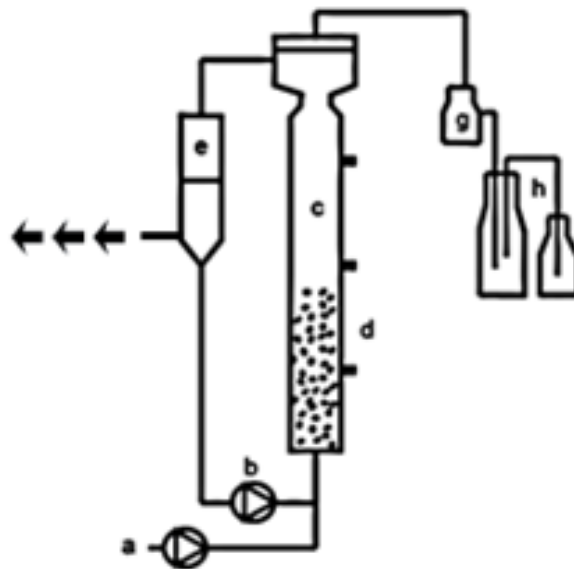


Figura 5. Reactor metanogénico de lecho fluidizado. Nomenclatura: a) bomba de alimentación; b) bomba de recirculación; c) tubo de cristal; d) lecho fluidizado; e) tubo de recirculación; g) trampa de carbón activado para compuestos volátiles; h) medidor de biogás.

la dirección del flujo, este pueden ser ascendente o inverso de acuerdo a la ubicación de entrada del efluente y por último la continuidad de las fases. Las configuraciones del reactor que favorecen la mezcla del líquido son apropiadas para reacciones que se inhiben por sustrato mientras que las configuraciones con flujo de pistón son más recomendables para las reacciones que son inhibidas por producto (Gódia & Solá, 1995).

Los RLF presentan las siguientes ventajas en comparación con otro tipo de reactores: Las bacterias inmobilizadas son más resistentes a tóxicos y a fluctuaciones en la alimentación además de que este tipo de reactores presenta mayor densidad celular en menor tiempo (Karamanev & Nikolov, 1991).

Los reactores de lecho fluidizado al no tener partes móviles y tener diseños tan sencillos presentan menores problemas de infiltración durante su operación. Los materiales que se emplean para su construcción y durante su operación no son caros (Herrera-López., 2007). El transporte de masa es alto y el uso de energía necesaria es más baja que en los CSTRs.

Los RLF debido a las ventajas que poseen son ampliamente usados en la industria en procesos como producción de etanol usando *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en partículas de gel (Moebus *et al.*, 1982), producción de acetona y butanol usando *Clostridium acetobutylicum* inmovilizado a una membrana esta investigación demostró que los costos pueden ser drásticamente reducidos a la mitad en comparación del mismo proceso en reactores batch.

Los RLF también son usados en tratamientos de aguas, investigaciones como la de Tsuneda *et al.* (2003) utilizaron microorganismos nitrificantes en el tratamiento de efluentes con 500 g/m^3 de NH_4 después de 300 días el consorcio creció 346 um y se logró una remoción eficiente del efluente.

Zarate-Segura *et al.* (2004) evaluaron la remoción de PCE en reactores metanogénicos agitados y de lecho fluidizado obteniendo mayor remoción en sistemas de lecho fluidizado con una concentración inicial de 40 mg/L de PCE y removiendo el 98% del contaminante. Debido a las características antes mencionadas y los trabajos previos se ha considerado a los RLF como una herramienta prometedora en el tratamiento de altas concentraciones de PCE.

1.7 Tecnologías abióticas para el tratamiento de PCE

El PCE se degrada abióticamente mediante dos procesos., la hidrólisis en donde se sustituye un cloro por un grupo hidroxilo para formar un alcohol clorado que posteriormente se hidroliza a acetato y mediante la eliminación o dehidrohalogenación, en donde un cloro es removido de un átomo de carbono y un átomo de hidrogeno se elimina del carbón adyacente formando DCE como se observa en la figura 4.

El PCE se degrada al mismo tiempo por hidrólisis y eliminación, pero la tasa de hidrólisis es superior en velocidad a la eliminación por aproximadamente un factor de cinco (Elsner *et al.*, 2008).

1.7.1 Partículas de Hierro para la remoción de PCE

En la actualidad las herramientas abióticas para la degradación de compuestos clorados parecen una tecnología prometedora en la remoción de PCE. La mayoría de estas herramientas abióticas contienen al ion Fe (Fig. 6) debido a su bajo costo, abundancia, facilidad de uso y reactividad. Así mismo usan a sus derivados como ZVI, pirita, FeS, treolita y mackinawita, que arrojan como principal metabolito final acetileno (Rosenthal *et al.*, 2004).

Los compuestos antes mencionados no tienen el mismo potencial de degradación. Lee & Batchelor (2002) degradaron PCE y todos sus metabolitos utilizando pirita y magnetita y encontraron que la pirita removi6 del 30 al 50% del compuesto clorado, removiendo de 23 a 40 veces más que la magnetita, además de que establece por reportes previos que la pirita es de 2 a 5 veces menos reactiva que Zn(0) y de 1390 a 2900 veces menos reactiva que la mackinawita y que la treolita.

La mackinawita es la fase más reactiva del FeS. La forma de producir estos compuestos también influye en su eficiencia para degradar al PCE, por ejemplo He *et al.* (2010) comparo la reactividad del FeS al estar o no congelado, concluyendo que el FeS congelado necesita 56 d para remover el PCE que en 28 d remueve el FeS no congelado.

1.7.2 Nanopartículas de Hierro

Una forma de lograr obtener mayores remociones de PCE y de sus metabolitos se logra utilizando nanopartículas (Carroll *et al.*, 2013). Las nanopartículas están caracterizadas por su tamaño diminuto que oscila entre 1 a 100 nm (El-Temsah & Joner, 2013).

Debido a su tamaño tan pequeño, sus propiedades son diferentes comparadas con sus contrapartes milimétricas. Las nanopartículas tienen mayor superficie de contacto, el incremento en el área de contacto hace que la reacción de deshalogenación se lleve a cabo más rápidamente (Li *et al.*, 2014).

La capacidad de remoción de las nanopartículas (NPs) está muy relacionada con su tamaño; algunas investigaciones sugieren que el uso de partículas más pequeñas permite remociones mayores, como lo reporta Lin *et al.* (2008) los cuales usaron NPs de 100 y 500 nm para el tratamiento del colorante negro 24.

Los resultados muestran que las partículas más pequeñas obtuvieron remociones 90 veces mayores. Las partículas muy pequeñas no siempre son del todo recomendables para el tratamiento de aguas, pueden ser tan reactivas que no puedan ser acopladas a ningún proceso debido a su corto tiempo de vida (Cross *et al.*, 2014).

Además las NPs tienden a aglomerarse y formar agregados lo que les resta capacidad catalítica. Investigaciones recientes han comenzado a concentrar sus investigaciones en el uso de varios estabilizantes, surfactantes y membranas para así poder embeber a las NPs y darles mayor estabilidad (Su *et al.*, 2007).

Los estabilizantes aumentan las repulsiones esteáricas o electrostáticas entre las partículas para así inhibir la agregación e incrementar la estabilidad de la solución de NPs (Phenrat *et al.*, 2007).

Uno de esos estabilizantes es la carboxi metil celulosa (CM), la cual es un material económico, muy soluble y altamente biocompatible (He *et al.*, 2010). Durante la investigación de He *et al.* (20120) se usó CM para estabilizar NPs de ZVI que se utilizaron para el tratamiento de lodos con PCE y metabolitos.

Los resultados muestran que el tratamiento con CM logro obtener mayores remociones del contaminante además de que el estabilizante fue usado por los microorganismos como fuente de carbono. Roman *et al.* (2013) comparó varios estabilizantes; (CM, poliacrilato, y poliaspartato) para NPs utilizadas para el tratamiento de lindado.

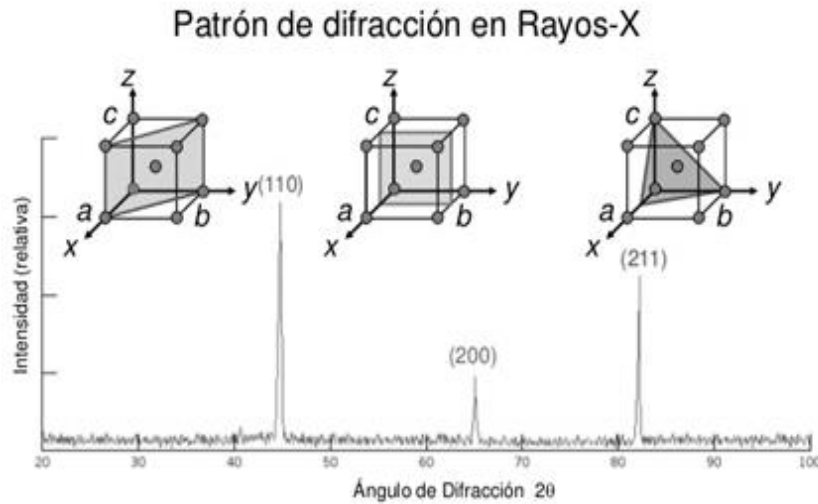


Figura 6. Patrón de difracción para un policristal de hierro – α (BCC)

El poliacrilato fue el mejor estabilizante, removió mayor cantidad del contaminante en menor tiempo comparado con el poliaspartato. El tratamiento con CM fue el que logro remover menos. Durante las primeras 12 horas las diferencias en remoción fueron del 25% entre el poliacrílico y el poliaspartato sin embargo después de 50 horas ambos tratamientos habían logrado el 100% de remoción. La decisión de cual estabilizante utilizar depende de otros factores como costo y facilidad de manejo.

A lo largo de los años los investigadores han probado con varios estabilizantes, surfactantes como sodio dodecil sulfato, tetrabutyl-amonio, poliacrílico, poliaspartato, ácido metacrílico, etc. todo para lograr preparar y usar NPs más pequeñas, mas reactivas y más estables y aplicables in situ (Tosco *et al.*, 2014).

2 - Justificación

El PCE es el compuesto clorado más encontrado en aguas subterráneas. Este compuesto ocasiona daños a la salud humana por lo que es necesario desarrollar tecnologías que permitan tratar efluentes con altas concentraciones de PCE sin generar metabolitos.

La degradación biológica del contaminante es el proceso más eficiente y económico para el tratamiento del PCE y sus metabolitos.

Para demostrar que la degradación del compuesto se lleva a cabo por microorganismos, las herramientas moleculares podrían elucidar a los microorganismos clave del consorcio y confirmar su degradación biótica.

De igual importancia será elucidar si el acoplamiento de filtros metálicos de limadura de hierro así como nanoparticulados permitiría reducir las concentraciones de los metabolitos y aumentar la remoción de altas concentraciones de PCE.

3-Hipótesis

H1-El desempeño de los reactores de lecho fluidizado híbridos acoplados con filtros abióticos (RLF híbridos) tendrán una remoción superior a los RLF sin filtros.

H2-Los filtros de Fe generaran mayores remociones de PCE en comparación con los filtros de Fe y arena

4-Objetivos

General

Evaluar el desempeño del RLF ante incrementos sustanciales de PCE así como el efecto del acoplamiento de dichos biorreactores con filtros de Fe y de nanofiltros de Fe.

Específicos

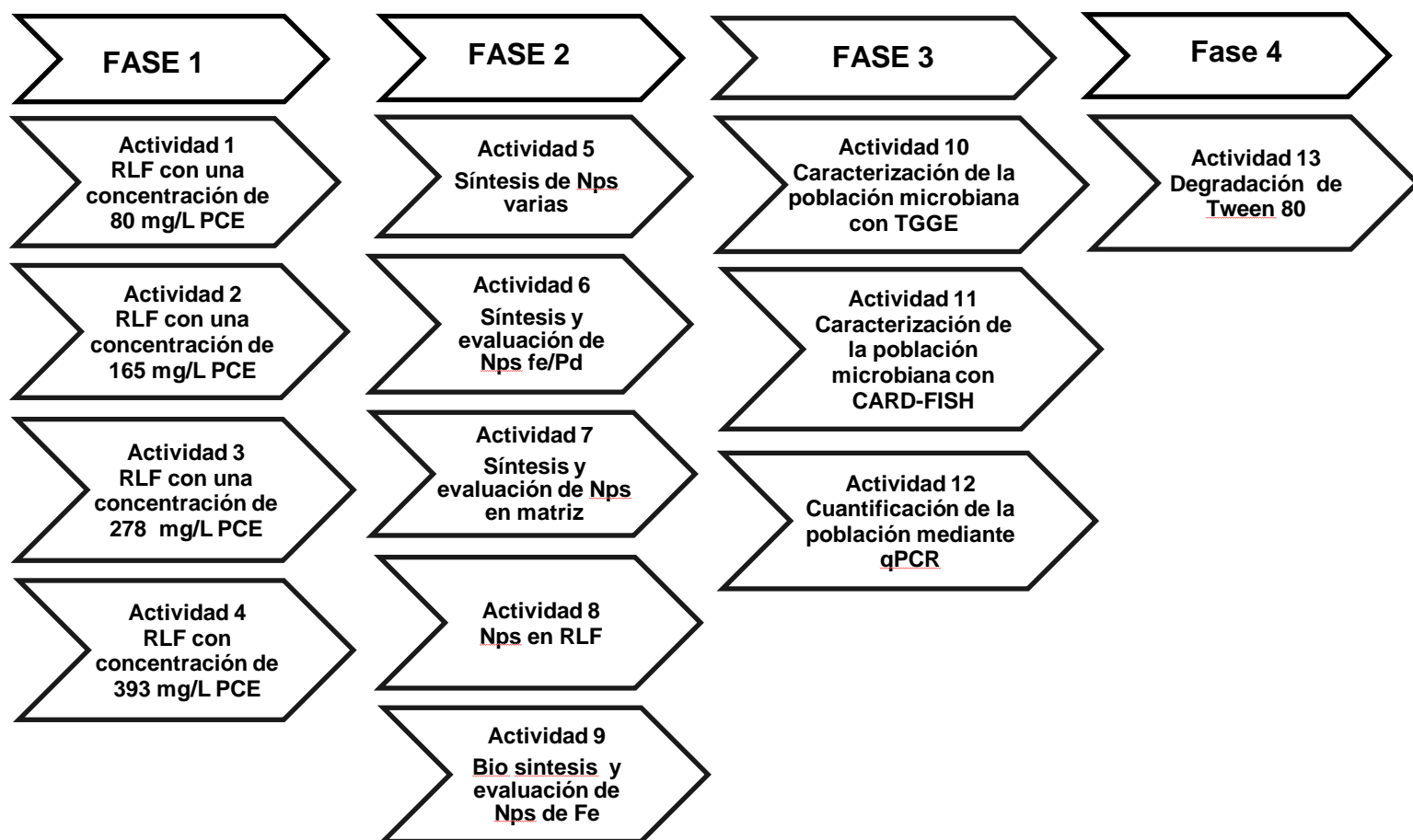
- Evaluar el desempeño del RLF a altas concentraciones de PCE
- Determinar la mejor herramienta abiótica para acoplar a la biorremediación de los RLF.
- Evaluar la remoción del tensoactivo Tween 80
- Evaluar los cambios microbianos poblacionales durante los incrementos de PCE y en otras condiciones de operación.

5. Materiales y Métodos

5.1 Estrategia de Trabajo

La estrategia de trabajo se dividió en cuatro fases temáticas y trece actividades. La primera etapa corresponde a la operación de los reactores, la segunda fase corresponde a la síntesis de nanopartículas. La tercera fase corresponde a los análisis moleculares y la cuarta fase corresponde a la evaluación de la degradación del Tween 80 (Fig.7).

Figura 7. Estrategia de trabajo



5.2. Operación de reactores de lecho fluidizado con incrementos en la concentración de percloroetileno

5.2.1 Propósito

Operar los reactores de lecho fluidizado con incrementos graduales en la concentración de PCE, para aclimatar al consorcio a altas concentraciones del compuesto y conocer su límite metabólico ante el contaminante.

5.2.2 Diseño Experimental

El diseño experimental fue un factorial a dos niveles, (*i*) cantidad de PCE alimentada y (*ii*) presencia o ausencia de filtros abióticos.

5.2.3 Programa de Monitoreo

Durante el seguimiento y análisis de los reactores de lecho fluidizado se evaluaron los parámetros presentados en la Tabla 2

5.2.4 Técnicas y Procedimiento

Se operaron cuatro reactores de lecho fluidizado como los mostrados en la figura 8. Dos reactores se usaron para acoplarles un filtro de arena y limadura de hierro (HFBB) y los otros dos reactores fueron operados sin filtro (MFBB). Los reactores son columnas de vidrio de 5.4 cm de diámetro y 1.5 mm de grueso; con una capacidad de 3.5 L total y 2.8 L de volumen útil.

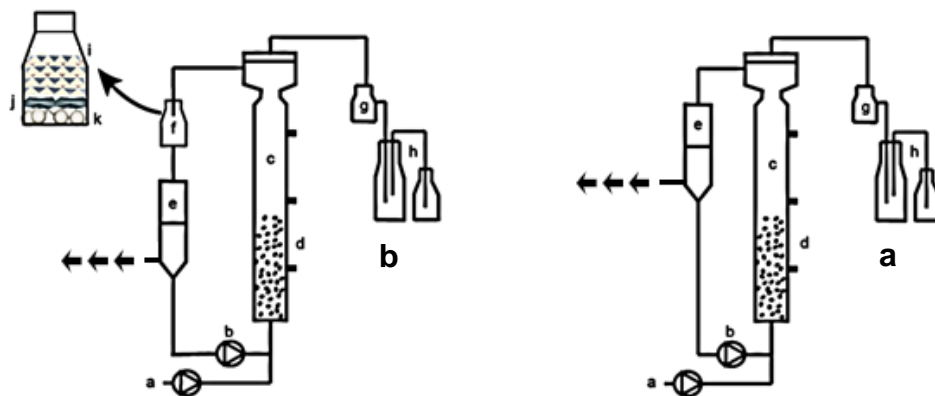


Figura 8. Reactores de lecho fluidizado. Donde el cuadro a es el MFBB y el cuadro b es el HFBB el cual tiene acoplado el filtro de hierro.

Tabla 2. Plan de seguimiento de los biorreactores de lecho fluidizado

Parámetro	Afluente	Efluente	Biopartículas	Biogas	Método
DQO	2/semana	2/semana	NA	NA	1
Biomasa (TKN/g)	NA	NA	1/mes	NA	1
pH	2/semana	2/semana	NA	NA	2
Alcalinidad	2/semana	2/semana	NA	NA	2
Volumen biogás	NA	NA	NA	1/día	3
Conc. de CH ₄ (%)	NA	NA	NA	2/semana	4
AME ^a	NA	NA	1/mes	NA	5
ADE	NA	NA	1/mes	NA	6
TRE	NA	NA	1/mes	NA	7
ΔCI^-	1/periodo	1/periodo	NA	NA	1
PCE y metabolitos	1/semana	1/semana	1/periodo	1/periodo	8
CARD-FISH	NA	NA	4to periodo	NA	9
qPCR	NA	NA	Cada periodo	NA	10
TGGE	NA	NA	1er periodo	NA	11

Notas: ^aActividad metanogénica específica; Referencia: 1 American Public Health Association, Methods for the examination of water and wastewater (1998); 2 Ripley *et al.* (1986); 3 Por desplazamiento de salmuera ácida; 4 Poggi-Varaldo *et al.* (1997) ; 5 Sorensen & Ahring, (1993); 6 Sánchez *et al.* (2000); 7 Kristensen & Jorgensen (1992); 8 Cromatográfico (se registrará cuando se inicie la alimentación con PCE).

Los biorreactores fueron inoculados con lodos provenientes de digestores anaerobios metanogénicos. Siguiendo la metodología del grupo (Poggi-Varaldo *et al.*, 1997; Escamilla-Alvarado *et al.*, 2013). Después de que se les adicione el lodo, permanecieron en contacto con las partículas de carbón, 15 d. para que lograran colonizarlo y obtener biopartículas que fueran capaces trabajar en el sistema.

Una vez que las biopartículas estaban listas, permanecieron en recirculación pero sin ningún contaminantes. Finalmente fueron aclimatadas a 80 mg/L de PCE y continuaron metanogénicos. Una vez que las biopartículas estaban aclimatadas, comenzaron los retos a concentraciones incrementales de PCE. (Fig. 9).

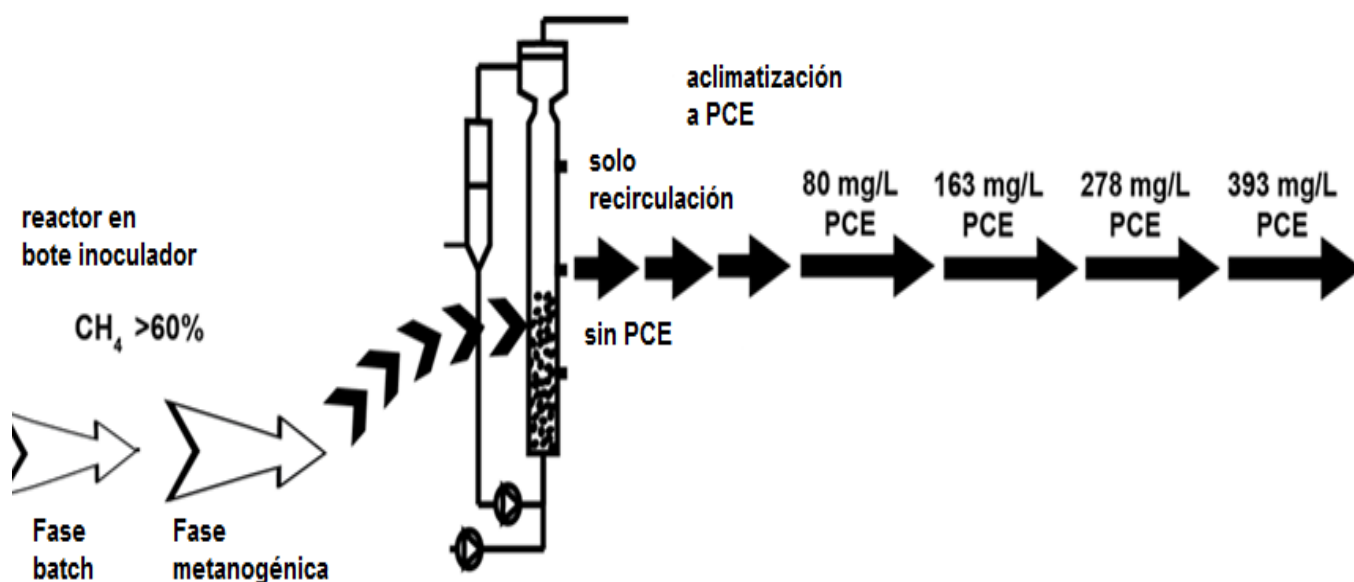


Figura 9. Etapas de los reactores de lecho fluidizado

Todos los días los reactores recibían un recambio del agua de alimentación la cual consistía de 0.89 g/L de $\text{PO}(\text{NH}_4)_3$ más agua corriente. Durante el recambio de agua no solo recibían un litro, también se les retiraba un litro del efluente para el sistema funciones como continuo. Ocasionalmente se le inyectó N_2 para retirar el vacío que se crea por la salida de inóculo.

La actividad contempló cuatro incrementos de PCE que fueron de 80, 163, 278 y 393 mg/L, (tabla 3). Cada etapa tuvo una duración de 120 días o hasta que el consorcio logre remover el 90% del contaminante y su desempeño sea estable. Durante cada etapa se preservó 1 g/L DQO así que las concentraciones de cada compuesto adicionado a la alimentación a largo de los periodos vario como se observa en la tabla 2, pero el resultado final siempre fue 1 DQO/gr.

La remoción de PCE se analizó por headspace en cromatografía de gases usando un cromatógrafo Perkin-Elmer Elite 624 series. La temperatura del inyector y del detector fueron 200°C y 250°C, la temperatura de la columna fue de 119°C.

La metodología de los procedimientos como CARD-FISH, qPCR, parámetros fisicoquímicos que se realizaron en esta actividad y que se utilizarán durante todo el trabajo se detallan en los ANEXOS, las referencias se encuentran detalladas en la tabla 2 y 4

Tabla 3. Alimentación de los reactores a lo largo de todos los periodos

[PCE] mg/L	80 mg/L		163 mg/L		278 mg/L		393 mg/L	
Parameter	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB
π_V^a (mg PCE/L _{FB} *d)	80	80	165	165	278	278	393	393
Tween 80 (mg/L)	NA	NA	80	80	135	135	190	190
MeOH ^b (mg/L)	667	667	536	536	493	493	370	370

Notes: ^a π_V ; ^b methanol

Las variables de respuesta utilizadas para procesar los resultados se presentan en la tabla 3

Tabla 4. Variables de respuesta para los reactores de lecho fluidizado

Variable de respuesta	Corriente	Ecuación
η_{DQO}^a	Efluente	$\eta_{DQO} = \frac{(DQO_a - DQO_e)}{DQO_a} \quad [1]$
CH_4 (%)	Biogás	-
α	Efluente	$\alpha = AI/AP \quad [2]$
I_{bg}	Biogás	$I_{bg} = \frac{\bar{Q}_{bg}}{V_r} \quad [3]$
I_{CH_4}	Biogás	$I_{CH_4} = \frac{\bar{Q}_{bg} \cdot \overline{CH_4}}{V_r} \quad [4]$

Notas: ^a Eficiencia de remoción de DQO; DQO_a: DQO de la alimentación; DQO_e: DQO en el efluente; AI: Alcalinidad intermedia; AP: Alcalinidad parcial; I_{bg}: Productividad de biogás; \bar{Q}_{bg} : Biogás producido por día; V_r: Volúmen del reactor; I_{CH₄}: Productividad de metano; $\overline{CH_4}$: Porcentaje de metano promedio.

5.3. Degradación de tween 80 por el consorcio de los reactores de lecho fluidizado: efecto del aceptor de electrones

5.3.1 Propósito

Cuantificar la degradación anaerobia del Tween 80 bajo tres diferentes aceptores de electrones, metanogénico, aeróbico y desnitrificante.

5.3.2 Diseño Experimental

El experimento fue un factorial general donde el factor fueron los aceptores de electrones, (CO₂, O₂ y NO₃).

5.3.3 Variables de respuesta

El Tween 80 fue determinado en términos de la concentración de ácidos grasos que lo constituyen y fueron consumidos por el consorcio (Miristoleico, Mirístico, Palmitoleico, Palmítico, Esteárico, Oleico, Linoleico)

Definimos al factor F_j como la relación de masa (medido en DQO) de un mol de ácido graso por la masa de ese ácido graso, así:

$$F_j = \frac{mg \cdot COD}{mg \cdot Fattyacid}$$

Donde “j” representa los ácidos grasos, Miristoleico, Mirístico, Palmitoleico, Palmítico, Esteárico, Oleico, Linoleico

$$[\text{Sum FA-COD}] \text{ (mg/L)} = F_{\text{oleic}} * [\text{Oleic}] + F_{\text{palmitic}} * [\text{Palmitic}] + \dots \quad [1]$$

Donde [Oleic] es la concentración de ácido oleico in mg/L y así sucesivamente. Controles abióticos también fueron corridos. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

5.3.4 Técnicas y Procedimiento

El análisis se llevó a cabo en reactores en lote, los cuales consistieron en botellas serológicas con una capacidad de 120 mL. Las botellas se llenaron con 60 mL de

agua sintética, 100 mg/L de Tween 80 como única fuente de carbón más el aceptor de electrones necesario.

Los reactores M y DN fueron gaseados con una mezcla de N₂/CO₂ (90/10) por 4 min. para mantener las condiciones anaeróbicas. Los reactores Ab fueron gaseados con O₂ por 4 min.

Además los reactores DN fueron suplementados con 800 mg/L de KNO₃. Después se agregó 1 gr de biopartículas provenientes de los RLF. Los reactores fueron incubados por 3 días en oscuridad con agitación magnética de 150 RPM para que el consorcio comenzara la degradación.

El equipo que se utilizó para realizar los análisis fue un Cromatógrafo de Gases - MS Perkin Elmer Clarus 580 MS Clarus SQ 8S Columna: Elite – 5 MS 30 m x 0.32 mm DI, 0.25 µm con un sistema MS cuadrupolo SQ 8S controlado con el Software TurboMass, los análisis fueron monitoreados en Modo SIM.

5.4. Degradación de percloroetileno asistida por nanopartículas: experimentos preliminares

5.4.1 Propósito

Sintetizar nanopartículas de FeS, Fe, Pd, FePd FeCoPd y combinaciones para encontrar la NP que remueva más PCE, que sea económica y factible para el proceso de remoción de PCE.

5.4.2 Diseño Experimental

Factorial general donde se evaluó la cantidad de PCE removido

5.4.3 Técnicas y Procedimiento

Síntesis de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se lleva a cabo en condiciones anóxicas para que el hierro no se oxide. Primero se preparó una solución con la sal metálica deseada, después se adiciono el tensoactivo tetra-n-butylammonium bromide (TBAB), la solución permaneció en agitación hasta que los compuestos estaban completamente disueltos. Posteriormente se preparó una solución con la segunda o tercera sal, y se disolvió en etanol. La solución de la segunda y tercera sal se vertió a la solución de la primera sal y permanecieron en agitación durante 2 h.

Después se colocaron 600 mg de NaBH_4 en 20 mL de agua y se adiciono lentamente a la solución metálica, si no había segunda o tercera sal, se pasó directamente a este paso. Una vez agregado el NaBH_4 , la solución se dejó agitando durante 2 h. a 90°C . Al final las nanopartículas se lavaron 5 veces con metanol para remover las impurezas y se secaron con N_2 a temperatura ambiente. Por último se pulverizaron y fueron almacenadas en un vial a temperatura ambiente.

Evaluación de las nanopartículas

Durante esta primera fase, se evaluaron solo la remoción de PCE, para encontrar la NPs mas reactiva en la remoción del contaminante.

La remoción de PCE se analizó por head-space en cromatografía de gases usando un cromatógrafo Perkin-Elmer Elite 624 series. La temperatura del inyector y del detector fueron 200°C y 250°C , la temperatura de la columna fue de 119°C .

5.5. Degradación de percloroetileno con nanopartículas bimetálicas Fe/Pd

5.5.1 Propósito

Sintetizar la nanopartícula bimetálica Fe/Pd en la proporción más económica y eficiente para remover PCE y sus metabolitos

5.5.2 Diseño Experimental

Factorial general, donde se evaluó la cantidad de Pd utilizado.

5.5.3 Técnicas y Procedimientos

Síntesis de Nanopartículas bimetálicas Fe/Pd

Primero se preparó una solución de Fe (III) disolviendo FeCl_3 en agua, después se adiciono el tensoactivo tetra-n-butylammonium bromide (TBAB), la solución permaneció en agitación hasta que los compuestos estaban completamente disueltos. Posteriormente se preparó una solución de Pd (II) utilizando Pd acetil-acetona disuelto en etanol. La cantidad de Pd (II) varió de acuerdo a la proporción que se estaba sintetizando (27.75, 16.81 and 5.55 $\text{mg}_{\text{Pd}}/\text{L}$).

La solución de Pd (II) se vertió a la solución de Fe (III) y permanecieron en agitación durante 2 h. Después se colocaron 600 mg de NaBH_4 en 20 mL de agua y se adicionó lentamente a la solución metálica, se dejó agitando durante 2 h. a 90°C . Al final las nanopartículas se lavaron 5 veces con metanol para remover las impurezas y se secaron con N_2 a temperatura ambiente. Por último se pulverizaron y fueron almacenadas en un vial a temperatura ambiente.

Caracterización de las nanopartículas bimetálicas Fe/Pd

La morfología de las nanopartículas Fe/Pd fue determinada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio HRSEM-AURIGA 3916. La composición química fue analizada usando el detector de energía dispersiva (EDS) acoplado al SEM. El análisis de difracción de rayos X (XRD) fue realizado para determinar la estructura y cristalinidad de las nanopartículas Fe/Pd. Los

patrones XRD fueron medidos utilizando un sistema Rigaku D/Max B radiación de Cu K α 1 ($\lambda = 1.5 \text{ \AA}$).

La medida del área superficial se midió mediante la técnica de adsorción utilizando la isoterma de Brunauer Emmett Teller (BET) usando un Autosorb-1 (Quantachrome Instruments) empleando N₂.

Las mediciones de Raman se hicieron con un espectrómetro HR800-UV Horiba – Jobin Yvon acoplado a un microscopio Zeiss Axiovert 200.

Evaluación de nanopartículas de Fe/Pd

Para evaluar la remoción de PCE se utilizaron botellas serológicas de 10 mL de capacidad con septa de teflón. Se preparó una solución con 200 mg/L de PCE que fue disuelto con Tween 80 (100 mg/L).

Las partículas bimetálicas Fe/Pd se adicionaron al sistema (56.5 mg/L). Además se utilizaron controles experimentales para asegurar que la remoción de PCE no fuera por evaporación o adsorción. Los controles experimentales consistieron de tratamientos solo con PCE, encontrando que se evapora el 3% del PCE en el sistema, valor que fue restado a los demás tratamientos. El PCE y sus metabolitos se analizaron por headspace en cromatografía de gases usando un cromatógrafo Perkin-Elmer Elite 624 series. La temperatura del inyector y del detector fueron 200°C y 250°C, la temperatura de la columna fue de 119°C.

5.6. Nanomembrana con nanopartículas de Fe para la remoción de PCE

5.6.1 Propósito

Sintetizar NPs de hierro embebidas en una matriz de algodón a dos concentraciones de Fe(NO₃)₃ (0.15 y 0.25 M)

5.6.2 Diseño Experimental

Factorial general donde se evaluó la concentración de la sal precursora y la cantidad de PCE removido.

5.6.3 Técnicas y Procedimientos

Síntesis de Nanopartículas de Fe embebidas en una matriz de algodón

Primero se prepararon soluciones de 0.15 M y 0.25 M de Fe (III) disolviendo $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ en 5 mL de etanol, posteriormente se adicionó 0.036 mg del tensoactivo dodecilsulfato sódico (SDS).

La solución permaneció en agitación hasta que los compuestos estaban completamente disueltos. Posteriormente se sumergió la membrana de algodón en la solución metálica de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ previamente preparada.

Después la membrana se metió al horno por una hora a 65°C, para secarse. Finalmente se colocó en el tubo de cuarzo para poder permanecer en el horno durante 3 horas a 350 °C con un flujo de H_2 constante.

Caracterización de las nanopartículas de hierro embebidas en la matriz

La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo como se especificó en la actividad anterior.

Evaluación batch de nanopartículas de hierro embebidas en la matriz

Para evaluar la remoción de PCE se utilizaron botellas serológicas de 10 mL de capacidad con septa de teflón. Se preparó una solución con 80 mg/L de PCE a la cual se le adicionó la membrana nanopartícula.

El PCE y sus metabolitos se analizaron por headspace en cromatografía de gases usando un cromatógrafo Perkin-Elmer Elite 624 series. La temperatura del inyector y del detector fueron 200°C y 250°C, la temperatura de la columna fue de 119°C

Filtro nanoparticulado para los reactores de lecho fluidizado

Se construyó un filtro de plástico capaz de soportar la membrana nanopartícula de hierro. El filtro contiene un eje transversal que sostiene una base tipo malla de 2 mm aprox. Sobre la base se colocó la membrana nanopartícula. El eje transversal es capaz de sostener hasta 5 bases por si el proceso requiere el acoplamiento de más membranas nanopartículas. La base evita que la membrana se desintegre y llegue al interior del reactor.

5.7. Bionano-biopartículas de magnetita para la remoción de percloroetileno

5.7.1 Propósito

Utilizar las capacidades reductoras del consorcio presente en el reactor de lecho fluidizado híbrido para sintetizar nanopartículas de hierro y así poder utilizar la capacidad reductora del metal de forma inmediata sin pérdidas de reactividad y de una forma sustentable sin el uso de químicos.

5.7.2 Diseño Experimental

Factorial general donde se evaluó el tipo de sal metálica FeCl_3 o $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ así como las concentraciones de las sales metálicas (0.15 M y 0.25 M).

5.7.3 Técnicas y Procedimiento

Síntesis de las bio-nanopartículas de magnetita

La síntesis de magnetita se llevó a cabo utilizando las capacidades reductoras del consorcio que habita las biopartículas de los RLFH. Se utilizaron dos sales precursoras FeCl_3 o $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ a dos diferentes concentraciones 0.15 y 0.25 M.

El precursor de la magnetita fue preparada de la siguiente manera, se disolvió en agua ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) (0.89 mg/L) mas MeOH (3ml/L) que fungió como donador de electrones después se le adiciono alguna de las dos sales precursoras y se agito durante algunos minutos posteriormente se ajustó el pH a 5.

Esta solución se colocó en un frasco serológico de 60 mL con 5 gr de biopartículas del consorcio. Posteriormente se dejó incubando durante 3 días a 28°C. Al final de este tiempo se adiciono 80 mg de PCE y se comenzaron los análisis cromatógrafos.

Caracterización de las bionano-biopartículas de magnetita

La morfología de las bionano-biopartículas fue determinada usando microscopía electrónica de barrido (SEM) con el microscopio HRSEM-AURIGA 3916. La

composición química fue analizada usando el detector de energía dispersiva (EDS) acoplado al SEM. Además se realizó un análisis de difracción de rayos X (XRD) este fue realizado para determinar la estructura y cristalinidad de las nanopartículas Fe/Pd. Los patrones XRD fueron medidos utilizando un sistema Rigaku D/Max B radiación de Cu K α 1 ($\lambda = 1.5 \text{ \AA}$).

Los análisis de TEM permitieron observar la forma, dispersión de las bio-NPs más pequeñas además de que el análisis de IELS permitió confirmar el estado de oxidación del hierro.

Evaluación batch de las bio-nano biopartículas de magnetita

Para evaluar la remoción de PCE se utilizaron botellas serológicas de 60 mL de capacidad con septa de teflón. Las botellas fueron adicionadas con 5 gr de biopartículas sintetizadas de bionanopartículas. Se preparó una solución con 80 mg/L de PCE y se llenaron las botellas, posteriormente de análisis la remoción con cromatografía. Los análisis cromatógrafos se realizaron por headspace en cromatografía de gases usando un cromatógrafo Perkin-Elmer Elite 624 series. La temperatura del inyector y del detector fueron 200°C y 250°C, la temperatura de la columna fue de 119°C.

6. Resultados y Discusión

6.1 Remoción de percloroetileno en los reactores de lecho fluidizado

La eficiencia de deshalogenación durante el primer periodo (80 mg/L PCE) fue alta y similar en ambos tipos de biorreactores, 97 y 98% para el MFBB y el HFBB respectivamente (Tabla 5 y 6). La eficiencia de deshalogenación disminuyó en ambos tipos de biorreactores cuando la concentración de PCE aumentó (Tabla 5).

En los periodos 1 y 2 (80 y 165 mg/L PCE en alimentación, respectivamente) los valores de la eficiencia de remoción fueron altos. En el periodo 3, el promedio de la eficiencia de deshalogenación fue del 65%. Sin embargo en el periodo 4 el promedio de la eficiencia de deshalogenación fue baja, del 48% para MFBB y 55% para HFBB. La eficiencia de remoción de PCE siguió patrones similares a los de la eficiencia de deshalogenación.

Los valores descritos primero fueron un poco menores que los últimos, como era de esperarse. La eficiencia de remoción de PCE en los periodos 1 y 2 fue mayor al 90% para ambos tipos de reactores, siendo un poco mejor el HFBB. En el periodo 3 (278 mg/L PCE) se presentó una disminución en la remoción de PCE, los valores fueron 77 y 88% para MFBB y HFBB, respectivamente.

Hubo un efecto negativo por el incremento en la concentración de PCE en el desempeño de los biorreactores, el cual fue particularmente evidenciado en el periodo 4, donde la remoción de PCE fue del 52 y 58% para el MFBB y HFBB respectivamente. En gran parte, las tendencias en la eficiencia de deshalogenación de PCE fueron paralelas y consistentes.

El acoplamiento del filtro de ZVI en el reactor HFBB fue asociado a mayores remociones de PCE en todos los periodos (Tabla 5). En los periodos de operación 1 y 2, las remociones promedio del reactor HFBB fueron altas 99 y 96% respectivamente.

Tabla 5. Concentración de PCE y metabolitos a lo largo de los periodos

[PCE] mg/L	80 mg/L		163 mg/L		278 mg/L		393 mg/L	
Parameter	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB
$\eta_{\text{deshalog}}^{\text{a}}$ (%)	97.12 ± 1.14	98.01 ± 0.67	81.10 ± 4.24	86.76 ± 3.94	64.08 ± 2.64	67.82 ± 3.80	47.72 ± 5.07	54.89 ± 4.68
$\eta_{\text{PCE}}^{\text{b}}$ (%)	98.90 ± 2.24	99.06 ± 2.51	90.15 ± 3.14	95.70 ± 2.95	77.45 ± 3.64	88.57 ± 2.95	52.41 ± 6.12	58.26 ± 5.03
$\eta_{\text{PCE}}^{\text{c}}$ (%) _{ST}	98.37 ± 2.01	99.05 ± 1.12	93.48 ± 3.47	99.28 ± 2.16	91.32 ± 3.56	98.45 ± 1.98	90.44 ± 2.12	97.36 ± 1.03
TCE in effl	< 0.001	< 0.001	0.58 ± 0.06	1.29 ± 0.08	0.57 ± 0.04	0.53 ± 0.06	1.89 ± 0.15	1.65 ± 0.46
DCE in effl	0.89 ± 0.12	2.45 ± 0.23	< 0.001	< 0.001	1.06 ± 0.09	0.03 ± 0.07	0.68 ± 0.02	0.28 ± 0.02
VC in effl	< 0.001	< 0.001	0.83 ± 0.09	1.11 ± 0.10	12.66 ± 0.04	11.02 ± 0.06	23.72 ± 2.64	11.47 ± 2.37
Ethylene in effl	0.05 ± 0.07	0.21 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.19 ± 0.08	0.07 ± 0.41	0.04 ± 0.22	0.98 ± 0.59	1.45 ± 0.29
pH	7.19 ± 0.16	7.51 ± 0.19	7.47 ± 0.19	7.37 ± 0.23	7.30 ± 0.04	7.16 ± 0.26	7.06 ± 0.05	7.33 ± 0.24
$\eta_{\text{COD}}^{\text{d}}$ (%)	93.60 ± 1.68	94.82 ± 1.20	71.18 ± 9	72.20 ± 10	96.25 ± 0.89	97.42 ± 1.58	79.80 ± 3.40	87.14 ± 4.03
CH ₄ biogas ^e (% v/v)	40.14 ± 11.19	44.28 ± 8.64	49.06 ± 7.64	23.15 ± 5.58	45.41 ± 0.21	24.51 ± 0.33	32.14 ± 1.33	26.33 ± 2.78
TKN ^f (mgN/g bpdry)	1.70 ± 0.02	1.78 ± 0.08	2.00 ± 0.07	1.40 ± 0.02	1.91 ± 0.75	1.16 ± 0.55	1.27 ± 0.42	1.26 ± 0.58
SMA ^g (mmolCH ₄ /gVS* h)	0.82 ± 0.09	0.76 ± 0.08	0.85 ± 0.09	0.80 ± 0.07	0.45 ± 0.09	0.66 ± 0.07	0.51 ± 0.05	0.36 ± 0.09
SOUR ^h (mmolO ₂ /gVS*h)	6.16 ± 1.44	6.65 ± 2.12	3.90 ± 1.44	2.42 ± 2.13	6.31 ± 1.22	7.41 ± 0.15	6.12 ± 0.30	7.25 ± 0.34
SDA ⁱ (mgNO ₃ /gVS *h)	148.56 ± 19.68	132.64 ± 28.41	172.60 ± 12.69	154.52 ± 19.02	112.60 ± 32.69	134.52 ± 29.02	147.14 ± 11.16	114.44 ± 15.75

Notes: ^a dehalogenating efficiency ^b PCE removal efficiency, ^c PCE removal in the stable subperiod, after the acclimation ^d COD removal efficiency, ^e methane productivity, ^f Total kjeldahl nitrogen ^g Specific methanogenic activity, ^h Specific oxygen uptake, ⁱ Specific denitrifying activity

El reactor HFBB removió una alta concentración de PCE y presento más bajas concentraciones de metabolitos que los reportados en el reactor MFBB durante los tres periodos. En el periodo 4, el promedio del desempeño de ambos tipos de reactores fue pobre. Sin embargo durante el periodo estable de operación (los últimos 50 días de operación).

El reactor HFBB alcanzó 97% de remoción de PCE versus el 90% de remoción encontrado en el MFBB. Estos valores altos de remoción sugieren un proceso de aclimatación que se puede observar durante el periodo 4. Un proceso similar ocurrió durante el periodo 3.

Tabla 6. Balance de cloro orgánico de los reactores

Periodo	80 mg/L PCE		165 mg/L PCE		278 mg/L PCE		393 mg/L PCE	
Parametro (% of organic Cl)	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB
Influyente	100	100	100	100	100	100	100	100
Efluente	3.12 ± 0.31	1.11 ± 0.52	18.08 ± 2.11	13.22 ± 1.13	36.47 ± 5.14	32.03 ± 2.10	52.71 ± 3.14	45.26 ± 2.87
Volatilizado	0.075 ± 0.021	0.075 ± 0.010	0.055 ± 0.009	0.025 ± 0.005	0.026 ± 0.006	0.012 ± 0.003	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001
Bioparticles	0.240 ± 0.098	0.240 ± 0.035	0.104 ± 0.025	0.063 ± 0.018	0.034 ± 0.006	0.056 ± 0.012	0.043 ± 0.025	0.035 ± 0.016
ZVI filtro	NA	0.010 ± 0.003	NA	0.012 ± 0.002	NA	0.019 ± 0.009	NA	0.394 ± 0.250

Los metabolitos producto de la deshalogenación del PCE, como TCE y DCE se presentaron en bajas concentraciones posiblemente debido a que continuaron su transformación a CV, la concentración de los metabolitos en el efluente se fue incrementando a lo largo de los periodos (Tabla 8).

En el primer periodo (80 mg/L PCE), se detectaron concentraciones bajas de CV en ambos biorreactores (0.001 mg/L). Mientras en el último periodo las concentraciones de CV fueron 24 y 12 mg/L para MFBB y HFBB, respectivamente. El reactor HFBB presento menor concentración de CV probablemente al filtro de ZVI, esto demuestra una mejora en la degradación del PCE (Ma & Wu, 2008). Además que esta inferencia es consistente con la mayor deshalogenación presentada en el HFBB.

Las concentraciones de PCE, TCE, DCE y CV determinadas en la trampa de biogas, mostraron resultados similares en ambos tipos de reactores y representan menos del 1% de la concentración (Tabla 8). En general la remoción abiótica de los clorados orgánicos fueron todas por debajo al 1% y siguieron esta tendencia: Bp, V and F, que significa los clorados orgánicos absorbidos en las biopartículas, lo volatilizado en la salida del biogas y por último lo absorbido en los materiales del filtro de ZVI, respectivamente.

(i) Bp > V > F, excepto en el periodo 4 donde fue F > Bp > V

(ii) MFBB > HFBB en periodos 3 y 4, cuando la concentración más alta de PCE se inyectó en la alimentación de los biorreactores.

Estos resultados son consistentes con la remoción adicional obtenida por parte de los filtros de ZVI acoplados a los HFBB.

Las concentraciones de cloro orgánico que representan los compuestos absorbidos en la cama de biopartículas presentes en los biorreactores siguieron la siguiente tendencia: (i) las concentraciones decrecieron durante la operación de los biorreactores (Fig. 10 y 11) esto fue inesperado porque el cloro orgánico en el efluente se incrementó y un efecto de equilibrio pudo trasladar el incremento en un incremento en las concentraciones encontradas en las biopartículas.

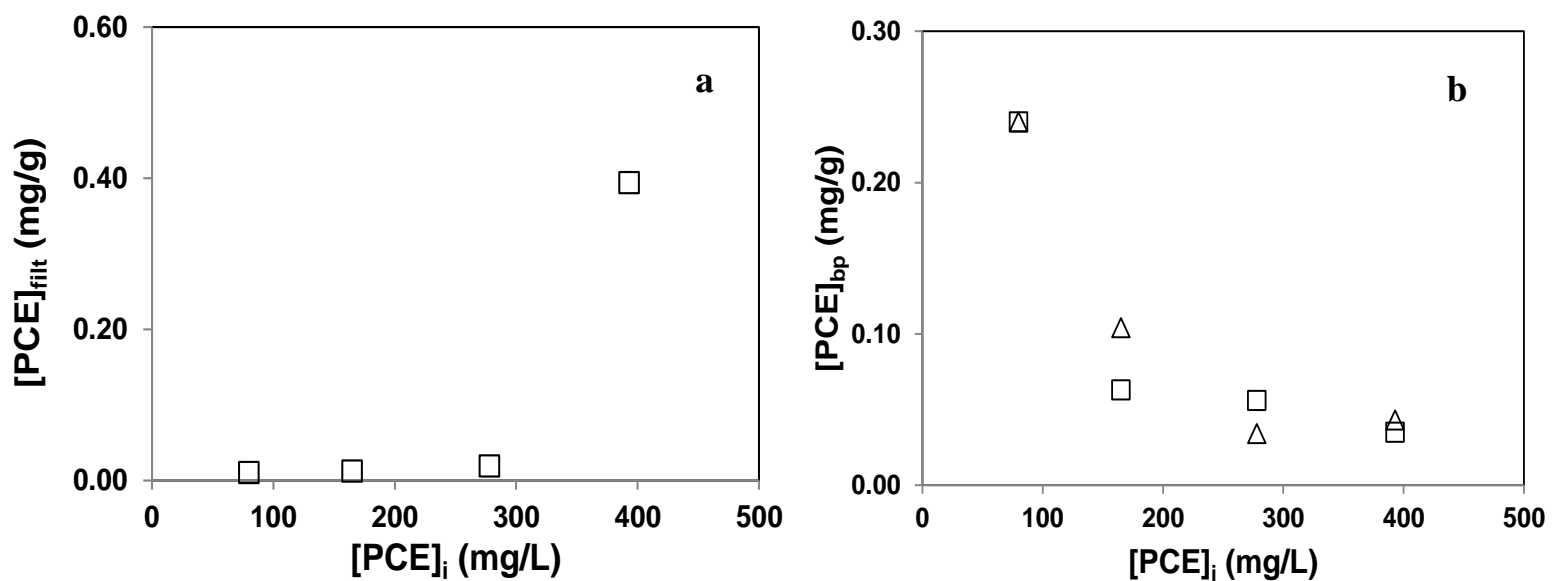


Figura 10. Concentraciones de cloro orgánico absorbidas. En los siguientes materiales a) biopartículas (bp) provenientes de los reactores, b) filtro de ZVI. nota: HFBB, cuadrados blancos, y MFBB, triángulos blancos; $[PCE]_{bp}$, concentración de PCE absorbida en las biopartículas y $[PCE]_{filt}$, concentración de PCE absorbida en el material del filtro de ZVI.

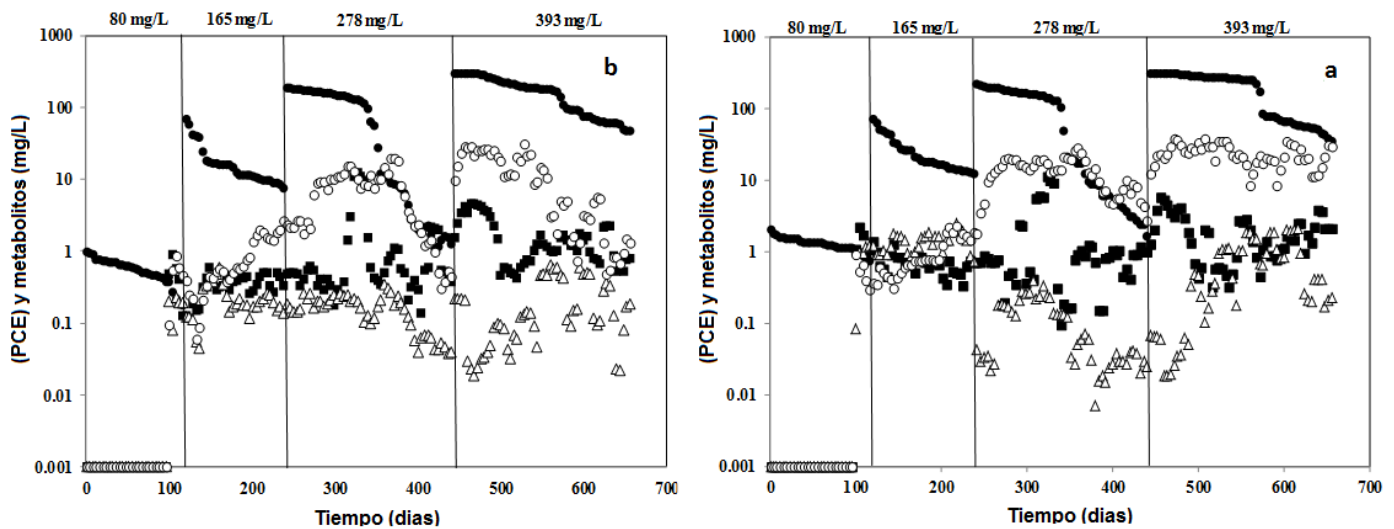


Figura 11. Dinámica de PCE y metabolitos. Donde a es MFBB y b es HFBB.

Además que pudo existir una biomasa activa que dinámicamente degradara los compuestos absorbidos, compuestos responsables del cloro orgánico. La bioregeneración de los soportes de carbón activado, ya está reportado en literatura (Aktas & Cesen *et al.*, 2006).

La consecuencia de tal proceso es la degradación de los contaminantes absorbidos y consecuentemente el reciclaje de sitios activos para la absorción de nuevas partículas de contaminante, i. e. esos sitios se pueden utilizar para más absorción o pueden permanecer vacíos.

El balance entre la absorción y la degradación determinara la acumulación neta del contaminante en las biopartículas. Entonces la concentración de los cloros orgánicos absorbidos en las biopartículas parece ser el resultado de una combinación de procesos dinámicos, entre la acumulación del contaminante por absorción y la eliminación de estos compuestos por bioregeneración. La investigación de Aktas y Cecen (2006) mostro que la bioregeneración depende del tipo de carbón activado que se usa.

Hablando de otros parámetros analizados a lo largo de la operación de los biorreactores es el CH_4 contenido en el biogas del MFBB el cual se mantuvo arriba

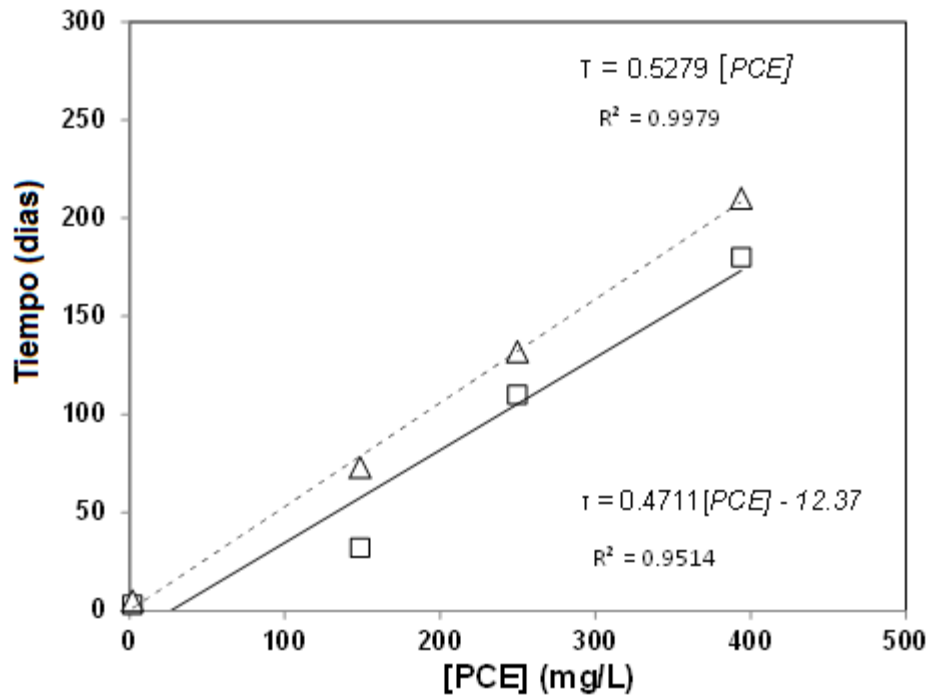


Figura 12. Periodo de aclimatación de las biopartículas al PCE. Muestra la relación entre el tiempo τ que tardan las biopartículas en remover al menor el 90% del PCE inicial. nota: HFBB, es cuadrados blancos; y MFBB, triángulos blancos

del 40% durante los primeros tres periodos, en el último periodo el valor del CH_4 disminuyó a 32%, probablemente debido a un impacto negativo de las altas concentraciones de PCE sobre la comunidad metanogénica del sistema (Aulenta *et al.*, 2002, Bereded-Samuel *et al.*, 1996).

El valor del CH_4 (en biogas) en el HFBB durante el primer periodo fue del 44% pero disminuyó a 23% en el segundo periodo y se mantuvo similar en los periodos 3 y 4 con 25 y 26% respectivamente. Parece ser que el filtro ZVI, la única diferencia entre los biorreactores, impacto a las poblaciones metanogénicas presentes, tal vez por el hidrogeno catódico liberado durante la remoción del PCE, este hidrogeno pudo desencadenar una competencia entre las bacterias metanogénicas y deshalogenante.

Al término del primer periodo (80 mg/L PCE) se realizaron análisis de TGGE, los resultados muestran los microorganismos de la tabla 11. Los microorganismos encontrados no están dentro de los reportados como degradadores de PCE sería el caso de todos excepto *Chlorobi bacterium* y *Desulfosporosimus orientis*.

Los reactores MFBB, previo a este periodo habían estado sometidos a un ambiente desnitrificante, los microorganismos encontrados *Bradyrhizobium diazoefficiens* y *Calditerrivibrio nitroreducens* son reductores de nitrógeno, anaerobios. Probablemente la concentración de PCE todavía no resultaba tan elevada para eliminarlos de la población microbiana presente. Además de que la forma en la que colonizan la biopartículas, los puede proteger del contaminante si se encuentran en el centro de esta.

Los microorganismos encontrados en los HFBB también están relacionados a la etapa previa de los reactores, estos reactores ya tenían un filtro de hierro acoplado, la presencia de *Acidimicrobium ferrooxidans*, bacteria oxidadora de hierro, no es de esperarse porque no es degradadora de PCE pero al haber el elemento que prefiere, encuentra un nicho ecológico perfecto para vivir. Las otras bacterias encontradas son *Desulfosporosimus orientis* y *Desulfonatronospira thiodismutans* (tabla 7).

Tabla 7. Secuencias encontradas en los bioreactores

R. Origen	Secuencia Ident.	Orden	Identidad (%)
MFBB	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	Rhizobiales	97
MFBB	<i>Chlorobi bacterium</i>	Chlorobiales	92
MFBB	<i>Calditerrivibrio nitroreducens</i>	Deferribacterales	93
HFBB	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Acidimicrobiales	90
HFBB	<i>Desulfosporosimus orientis</i>	Clostridiales	92
HFBB	<i>Desulfonatronospira thiodismutans</i>	Desulfohalobiales	97

Los análisis no resultaron concluyentes y fue necesario implementar otras técnicas que fueran más específicas y permitan evaluar todo el proceso pero con el objetivo

de buscar microorganismos clave. Rastrear estos microorganismos como *Dehalococcoides* nos permitió tener mayor seguridad de que la remediación se llevó a cabo de forma biológica.

Para tener un panorama más amplio de la comunidad microbiana se realizaron qPCR de todas las etapas, concentrándonos en encontrar el gen específico para *Dehalococcoides*, único microorganismo de llevar a cabo una degradación del contaminante total.

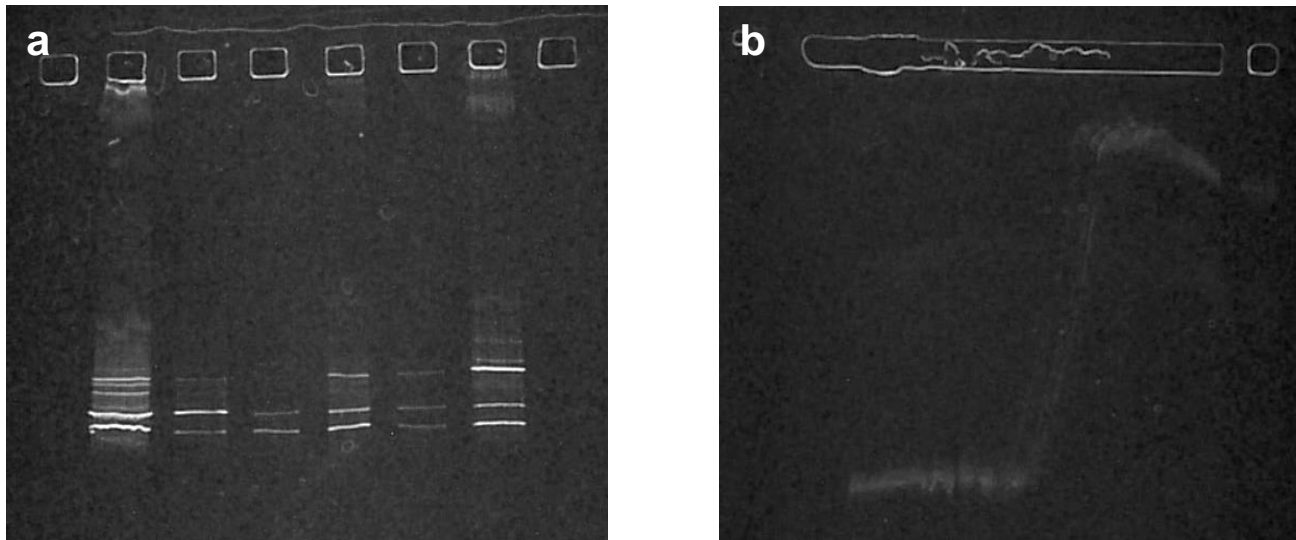


Figura 13. Imagen de gel de electroforesis de TGGE. Donde a) gel representativo de las bandas encontradas, b) gel para encontrar las condiciones optimas

Cuantificación de la población mediante qPCR

Las copias de genes DHC (16S rRNA) encontrados al final de todos los periodos en ambos reactores, (Fig. 14) muestran como los *Dehalococcoides* se fueron aclimatando a las crecientes concentraciones de PCE.

Durante el primer periodo el HFBB presento ligeramente mayor cantidad de *Dehalococcoides*, la cual decayo en el segundo periodo. El MFBB si bien empezó con menor número de *Dehalococcoides*, para el segundo periodo se recuperó y la cantidad de *Dehalococcoides* fue mayor que en HFBB. En el tercer periodo la población de *Dehalococcoides* es similar. En el último periodo tenemos un aumento en la cantidad de genes DHC en los HFBB.

Los resultados de eficiencia de remoción de PCE presentados en la tabla 8. muestran una tendencia constante de mayor remoción de PCE en los HFBB, sin embargo las copias de genes DHC no siempre son mayores en los HFBB. Es necesario recordar que en los biorreactores se encuentran otros microorganismos degradadores de PCE como *Dehalobacter spp.*, *Desulfurospirillum spp.*, *Desulfitobacterium spp.*, and *Dehalococcoides spp* además de las arqueas *Methanosarcinas*. Estos microorganismos también estuvieron contribuyendo a la remoción del contaminante.

Tabla 8. Remoción de PCE y metabolitos encontrados en los periodos

[PCE] mg/L	80 mg/L		163 mg/L		278 mg/L		393 mg/L	
Parameter	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB	MFBB	HFBB
η_{deshalog}^a (%)	97.12 ± 1.14	98.01 ± 0.67	81.10 ± 4.24	86.76 ± 3.94	64.08 ± 2.64	67.82 ± 3.80	47.72 ± 5.07	54.89 ± 4.68
η_{PCE}^b (%)	98.90 ± 2.24	99.06 ± 2.51	90.15 ± 3.14	95.70 ± 2.95	77.45 ± 3.64	88.57 ± 2.95	52.41 ± 6.12	58.26 ± 5.03
η_{PCE}^c (%) _{ST}	98.37 ± 2.01	99.05 ± 1.12	93.48 ± 3.47	99.28 ± 2.16	91.32 ± 3.56	98.45 ± 1.98	90.44 ± 2.12	97.36 ± 1.03
TCE in effl	< 0.001	< 0.001	0.58 ± 0.06	1.29 ± 0.08	0.57 ± 0.04	0.53 ± 0.06	1.89 ± 0.15	1.65 ± 0.46
DCE in effl	0.89 ± 0.12	2.45 ± 0.23	< 0.001	< 0.001	1.06 ± 0.09	0.03 ± 0.07	0.68 ± 0.02	0.28 ± 0.02
VC in effl	< 0.001	< 0.001	0.83 ± 0.09	1.11 ± 0.10	12.66 ± 0.04	11.02 ± 0.06	23.72 ± 2.64	11.47 ± 2.37

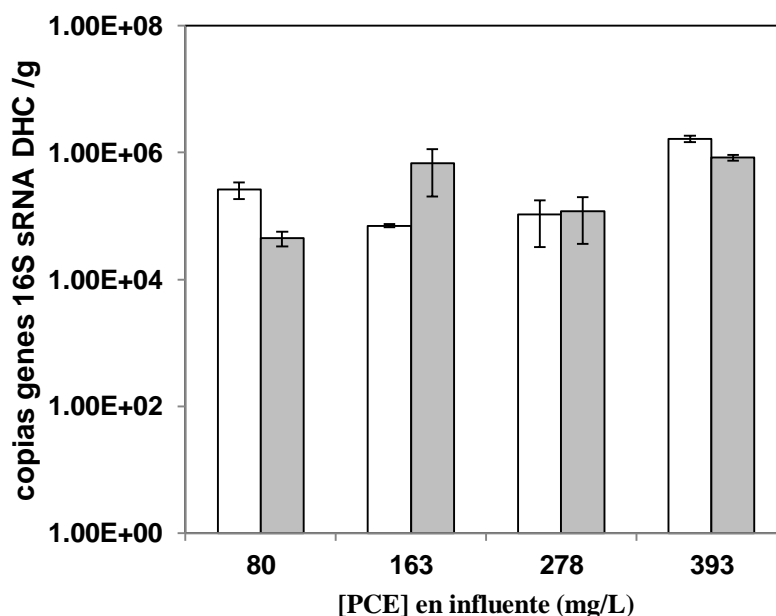


Figura 14. Copias de genes DHC encontrados en los bioreactores. Donde las barras claras pertenecen a HFBB y las barras oscuras a MFBB.

La importancia de poder cuantificar los genes clave de *Dehalococcoides*, el único microorganismo capaz de llevar a cabo la degradación completa del PCE hasta etileno, nos permite asegurar que el proceso se está llevando a cabo de forma biológica, que el contaminante no está simplemente siendo evaporado por alguna fuga o que la remoción del PCE es debida a una remoción abiótica.

Para conocer a profundidad que microorganismos influyeron en mayor proporción a la deshalogenación del compuesto sería necesario analizar genes clave de cada una de las especies dehalogenantes en los reactores y ver su evolución a lo largo de todos los periodos.

Además de tener en cuenta que existen otros factores que pudieron haber influido positivamente en que los reactores HFBB presentara mayores remoción de PCE comparado con el MFBB. Los filtros abióticos de ZVI pudieron ser una factor que ayudara a que las remociones fueran mayores en HFBB.

Caracterización de la población microbiana con CARD-FISH

Durante el último periodo se evaluó la comunidad presente en las biopartículas del consorcio. Concentraciones significantes de varias bacterias deshalogenantes fueron encontradas en los biorreactores durante la última etapa. Debido a las altas concentraciones de PCE en el efluente, se esperaba la presencia de una comunidad microbiana muy especializada en el proceso de deshalogenación.

Las cuentas de bacterias deshalogenantes en el inóculo metanogénico original fueron muy bajas (4.33×10^2 c mL⁻¹), esta cantidad es más baja que lo encontrado en ambos reactores durante el último periodo (Fig. 15). Otra diferencia en las comunidades microbianas entre el reactor inóculador ($t=0$) y la última etapa, son las bajas proporciones de arqueas encontradas durante este último periodo para ambos reactores, siendo 29.30 y 36.08% en HFBB y MFBB respectivamente, comparadas con el 44.89% que se encontró en reactor inóculador.

Esta diferencia puede reflejar el impacto negativo que sufrieron las arqueas metanogénicas de los reactores, resultados que coinciden con reportes que hablan de los efectos tóxicos del PCE a las metanogenas (Bered-Samuel 1996; Yu & Smith 2009).

Aunque también puede deberse al enriquecimiento en bacterias deshalogenantes durante la exposición a PCE, lo cual forzó a competir a ambos grupos microbianos por acetato, metanol o H₂. Debido a todo esto, las diferencias en la comunidad microbiana de ambos reactores comparada con la comunidad presente en el reactor inóculador metanogénico es significativa y describe un proceso de presión selectiva impuesto por las altas concentraciones de PCE a las que fue expuesta la comunidad.

En cuanto a las cuentas microbianas de los reactores MFBB Y HFBB durante el último periodo, solo las cuentas de *Dehalococcoides* y de *Sulfurospirillum* fueron significativamente mayores en HFBB que en MFBB ($p < 0.05$), mientras que las

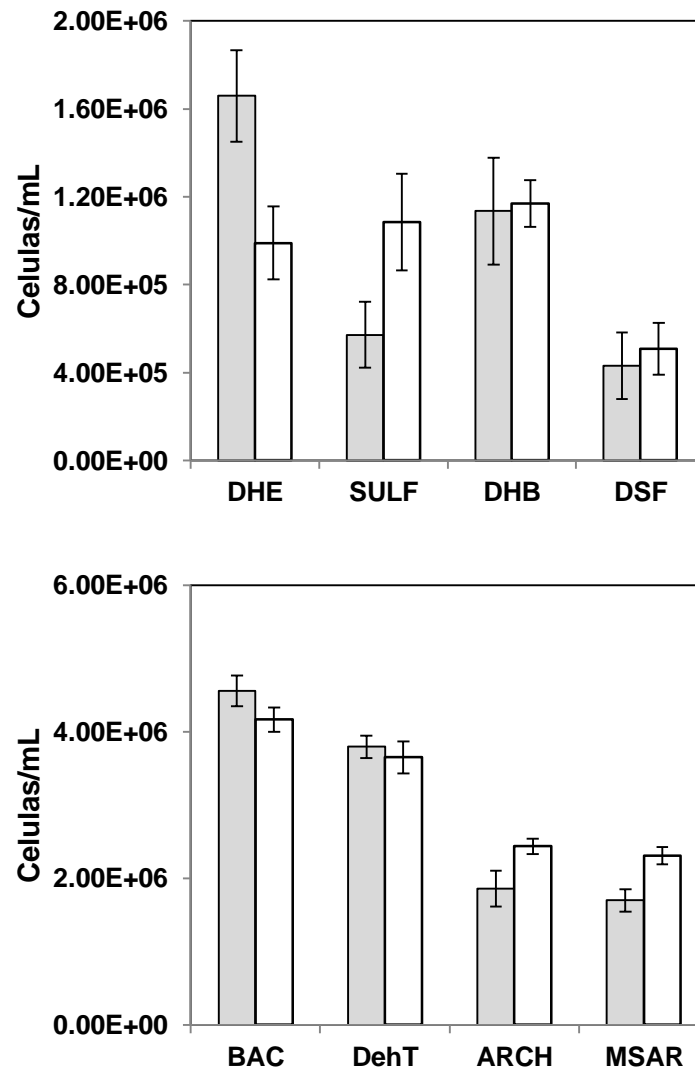


Figura 15. Población microbiana de los reactores de lecho fluidizado. Donde DHE es *Dehalococcoides*, SULF es *Sulfurospirillum*, DHB representa a *Dehalobacter*; DSF, es *Desulfitobacterium*, BAC es bacteria, DehT representa a todas las bacterias deshalogenantes, ARCH a las archaeas y MSAR a las *Methanosarcina*

otras cuentas microbianas no tuvieron diferencias significativas entre ambos bioreactores (Kreyszing 1972, t de Student, comparación de medias).

Posteriormente un test similar (t-student) usando el log de las cuentas microbianas en lugar de las cuentas aritméticas, mostro que las poblaciones de *Dehalococcoides* y *Sulfurospirillum* fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en el HFBB que en el MFBB (Tabla 9)

Las cuentas de archaea y *Methanosarcina* fueron significativamente mayores en MFBB que en HFBB ($p < 0.05$). La transformación log de los datos parece que

incremento la sensibilidad del test y estandarizo los valores numéricos de las distribuciones Gaussianas, recordando que las cuentas de poblaciones microbianas son conocidas por mostrar una distribución log-normal (Montgomery, 1991).

La cantidad total de bacterias deshalogenadoras fue muy similar en ambos tipos de reactores HFBB y MFBB Fig. 37. El HFBB y el MFBB mostraron 90% y 87% del total de bacterias deshalogenantes como se puede apreciar en la tabla 12.

Una concentración mayor de bacterias deshalogenantes era esperada en los reactores HFBB. Debido a que investigaciones previas sugieren que el ZVI presente en los filtros, puede estimular la donación de electrones a las bacterias dehalogenantes vía hidrogeno (Lee *et al.*, 2007; Karri *et al.*, 2005; Yang & McCarty 1998; Rosenthal *et al.*, 2004; Xiu *et al.*, 2010). El H₂ ha sido reportado como uno de los donadores de electrones que más favorecen a los microorganismos deshalogenantes (Majone *et al.*, 2002).

El H₂ es conocido que puede ser generado abióticamente por el ZVI como es indicado en la Eq. 2 (Ma & Wu 2008; Becker 2006).



El destino del H₂ producido en el filtro de ZVI, en resumen, primero es disuelto en el agua de recirculación y entra al HFBB. Una vez ahí, el H₂ va con la corriente ascendente y entra en contacto con las biopartículas.

Se realizó una estimación del H₂ que podría estar en el licor del HFBB y es ca. 20 nM, a esta concentración los grupos microbianos que lo pueden utilizar como donador de electrones son algún miembro de las deshalogenantes presentes, *Dehalobacter spp.*, *Desulfurospirillum spp.*, *Desulfitobacterium spp.*, and *Dehalococcoides spp* o las arqueas *Methanosarcinas* (Tabla 9).

Tabla 9. Abundancia relativa de los microorganismos en los reactores

Microbial proportions (%)	MFBB	HFBB
<i>DehT/BAC</i>	86.89 ± 11.41	89.66 ± 1.85
<i>ARCH/(ARCH + BAC)</i>	36.08 ± 1.59	29.30 ± 2.17
<i>MSAR/ARCH</i>	95.45 ± 2.14	92.15 ± 1.58
<i>DHE/DehT</i>	26.38 ± 0.34	42.73 ± 2.09
<i>SULF/DehT</i>	28.91 ± 3.93	19.04 ± 0.16
<i>DHB/DehT</i>	31.17 ± 5.17	25.84 ± 3.22
<i>DSF/DehT</i>	13.55 ± 1.58	12.38 ± 1.29

Notes: *BAC*, eubacteria; *ARCH*, Archaea; *MSAR*, *Methanosarcina*; *DehT*, bacterias deshalogenantes totales; *DHE*, *Dehalococcoides*, *DHB* es *Dehalobacter*, *SULF* es *Sulfurospirillum*, y *DSF* *Desulfitobacterium*.

Aunque reportes indican que las deshalogenantes pueden utilizar concentraciones tan bajas como 11 nM en sistemas similares al nuestro, lo que les daría una ventaja comparadas con las *Methanosarcinas* (Lu *et al.* 2001; Mazur *et al.* 2003; Yang & McCarty 1998). La proporción de *Dehalococcoides* (*DHE/DehT*) en el HFBB fue ampliamente mayor que en el MFBB, 43 y 26% respectivamente.

En contraste otros microorganismos deshalogenantes como *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter*, *Sulfurospirillum* solo pueden degradar al PCE hasta DCE (Futagami *et al.* 2008). Así que la alta cantidad de *Dehalococcoides* presentes en el HFBB están en concordancia con las altas remociones del compuesto logrado en los HFBB así como también explica las bajas concentraciones de CV y de sus demás metabolitos (Tabla 9).

En general, las bajas proporciones de Arquea, eran de esperarse en ambos tipos de biorreactores. Debido a que es conocido que concentraciones de 100 mg/L pueden inhibir a los microorganismos metanogénicos (Bereded-Samuel *et al.*, 1996). En los reactores HFBB y MFBB la mayoría de arqueas pertenecen al género de las *Methanosarcinas spp.* 95 y 92% respectivamente. El reactor HFBB presento menor cantidad de arqueas que el MFBB (Fig. 15 y Tabla 9). Este patrón microbiano coincide con los resultados de la productividad de metano, contenido en biogas y de los valores de AME, los cuales son también menores para los HFBB.

6.2 Degradación de tween 80 por el consorcio de los reactores de lecho fluidizado: efecto del aceptor de electrones

El tipo de aceptores de electrones tuvo un efecto significativo en la degradación de Tween 80 ($p < 0.05$). Ciertamente, la remoción de Tween 80 en términos de SumFA fue en el orden $Dn > M > Ab$. (Fig. 16, Tabla 14).

El tratamiento Dn mostro la remoción más alta del surfactante Tween 80. Probablemente por tener la energía libre de Gibbs a favor para que se llevara a cabo la reacción después del tratamiento Ab que posiblemente estaba inhibido (Tabla 15). Al final del experimento la SumFA fue removida del 71%, donde el ácido oleico el principal acido componente del Tween 80 se removió un 69%. Los reactores metanogénicos (M) presentaron la segunda mejor remoción de SumFA del 55% y el ácido oleico se removió un 53%. Los resultados más pobres correspondieron a los reactores aerobios (Ab) que presentaron una remoción de SumFA del 37% y una remoción de ácido oleico del 32%, esta baja remoción puede deberse a la poca cantidad de microorganismos aerobios presentes en el inoculo además de la inhibición que pudieron haber sufrido los microorganismos anaerobios presentes (Ouattara 2003, Zarate-Segura *et al.*, 2004).

Importante, la tendencia de remoción de los SumFAs fue consistente con la tendencia encontrada en la remoción de toda la materia orgánica (también conocida como DQO y reportada como η DQO). Los resultados de esta variable fueron independientes de los reportados con la variable SumFA. Los resultados obtenidos de esta última variable fueron obtenidos cromatográficamente, mientras que los resultados obtenidos de η DQO fueron obtenidos mediante análisis químico usando un standard. La consistencia entre los dos resultados sugiere fuertemente la degradación completa de toda la molécula del Tween 80 en especial del tratamiento Dn.

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos tomados de la degradación del Tween 80 bajo diversos aceptores de electrones

Parameter	<i>Dn</i>	<i>M</i>	<i>Ab</i>
$\eta_{\text{Oleic}} (\%)^a$	69.48 ± 0.28	52.52 ± 0.97	31.74 ± 0.11
$\eta_{\text{Linoleic}} (\%)^b$	86.65 ± 0.27	84.73 ± 0.89	46.11 ± 0.66
$\eta_{\text{Palmitic}} (\%)^c$	36.91 ± 0.75	55.67 ± 0.83	38.56 ± 1.15
$\eta_{\text{Stearic}} (\%)^d$	72.53 ± 0.15	72.73 ± 0.97	65.25 ± 0.79
$\eta_{\text{Palmitoleic}} (\%)^e$	53.63 ± 0.96	59.68 ± 0.44	25.40 ± 1.03
$\eta_{\text{Myristoleic}} (\%)^f$	55.65 ± 0.23	51.61 ± 0.17	59.68 ± 0.14
$\eta_{\text{Myristic}} (\%)^g$	93.33 ± 0.09	88.00 ± 0.12	47.33 ± 0.36
$\eta_{\text{SumFA}} (\%)^h$	71.14 ± 0.24	55.16 ± 0.44	37.01 ± 0.50
$\eta_{\text{COD}} (\%)^i$	64.73 ± 1.85	56.20 ± 0.89	39.88 ± 0.66
pH	7.31 ± 0.02	7.14 ± 0.015	7.14 ± 0.02
CH ₄ (mmol/bottle)	0.58 ± 0.03	0.70 ± 0.01	0.13 ± 0.02
TKN (bgN/g dry _{bp}) ^j	2.10 ± 0.07	2.00 ± 0.05	1.95 ± 0.04
SMA (mmolCH ₄ /gVSS*h) ^k	0.42 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.17 ± 0.01

^a removal efficiency of oleic acid; ^b *ibidem* of linoleic acid; ^c *ibidem* of palmitic acid; ^d *ibidem* of stearic acid; ^e *ibidem* of palmitoleic acid; ^f *ibidem* of myristoleic acid; ^g *ibidem* of myristic acid; ^h removal efficiency of fatty acids; ⁱ removal efficiency of organic matter as COD; ^j total Kjeldahl nitrogen as a surrogate measurement of biomass in bioparticles; ^k specific methanogenic activity of bioparticles

El ácido oleico el principal componente del Tween 80, representa el 62% de todos los ácidos de la molécula Tween. La remoción de este ácido siguió la tendencia encontrada en las remociones SumFA y DQO.

Además de la evaluación del ácido oleico también se evaluó el descenso de los otros ácidos grasos que componen a la molécula Tween 80, *i.e.* linoleico, palmítico, esteárico, palmitoleico, miristoleico y mirístico.

El consumo de varios de los ácidos grasos siguió la tendencia del ácido oleico, que es, que en el tratamiento Dn se presentaron las mayores remociones.

El ácido palmítico se removió un 56% en el tratamiento M, seguido de un 39% en el Ab y por último un 37% en el tratamiento Dn. Las remociones del ácido palmitoleico fueron mayores en el tratamiento M con un 60 % seguidas de un 54% en el Dn y por último en el Ab fue del 25%. Sin embargo, la concentración inicial de esos ácidos grasos fue realmente baja (4.1 y 2.1 mg/L de ácido palmítico y palmitoleico, con base DQO, respectivamente). Por lo que sus tendencias no influenciaron la principal tendencia de remoción reportada en SumFA y DQO.

La alta degradación del ácido oleico y de los demás ácidos de cadena corta en el tratamiento Dn y M era de esperarse, debido a que el consorcio típicamente ataca primero a los ácidos grasos de cadena corta (Hanaki *et al.*, 1981).

La lenta degradación de los ácidos grasos de cadena larga tiene que considerarse para aplicaciones *in situ* debido a que su acumulación puede resultar tóxica particularmente para los microorganismos metanogénicos acetoclasticos. Sin embargo esta acumulación debe de ser arriba de los 300 mg/L para consorcios no aclimatados mientras que los aclimatados toleran hasta 3000 mg/l de ácidos orgánicos (Canovas-Diaz *et al.*, 1991, Novak & Carlson, 1970).

Con respecto al posible efecto tóxico de algunos ácidos grasos que pueden ser parte de la molécula Tween 80, investigadores como Lalman & Bagley (2001) mostraron que 30 mg/L de ácido linoleico es inhibitorio para la metalogénesis. Además Angelidaki & Ahring (1992) determinaron que 100 mg/L de ácido oleico es tóxico a los microorganismos metanogénicos termófilos. En otro trabajo Lalman & Bagley (2001) observó que la metalogénesis comenzó a ser inhibida con 10 mg/L de ácido oleico. Koster & Cramer (1987) encontró que cualquier ácido, mirístico, láurico o cáprico arriba de los 300 mg/L es inhibitorio a microorganismos metanogénicos presentes en reactores batch.

Tabla 15. Energía libre de Gibbs de la degradación de glucosa

Electron acceptor regimes	Typical reaction with hexose as carbon source	ΔG° ^a (kJ/reaction)
Aerobic (<i>Ab</i>)	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	-2880
Denitrifying (<i>Dn</i>)	$5C_6H_{12}O_6 + 24NO_3 + 24H \rightarrow 30CO_2 + 42H_2O + 12N_2$	-2720
Methanogenic (<i>M</i>)	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CO_2 + 3CH_4$	-428

^aThe values of ΔG° (kJ/reaction) are at 1 M, 101.8 kPa, and 25°C and pH 7 (Haynie, 2003)

Durante este trabajo, la concentración inicial de ácido oleico fue de 14 mg/L o expresado en DQO serían 51 mg DQO/L. La concentración máxima de ácido oleico en nuestros reactores batch.

En base del rendimiento energético de los substratos orgánicos, se esperaría que la degradación de Tween 80 fuera en un orden diferente al encontrado i.e. $Ab > Dn > M$. En efecto como se muestra en la tabla 15, el sistema aerobio es energéticamente más favorable para degradar la materia orgánica y el sistema metanogénico es el menos favorable.

La diferencia entre la remoción esperada y nuestros resultados pueden estar relacionados con el origen de nuestro inóculo. El inóculo consiste de biopartículas colonizadas por bacterias anaerobias tomadas de RLF metanogénicos usados en el tratamiento de influentes contaminados con PCE.

Típicamente el consorcio anaerobio que se aloja en los RLF es rico en arqueas metanogénicas, deshalogenantes y otras bacterias anaerobias como *Methanosarcinaceae*, *Methanosaetaceae*, *Dehalococcoides*, *Desulfuromonas*, *Desulfovibrio*, *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Thiomicrospira denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans* (Siggins *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Marzorati *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2005; Criddle *et al.*, 1990; Robertson & Kuenen, 1984, Bretón-Deval *et al.*, 2015).

La presencia de bacterias aerobias típicamente es baja en RLF metanogénicos y similar en otros biorreactores anaerobios (Ouattara *et al.*, 2003). Por otro lado algunos microorganismos anaerobios anidados en los RLF son capaces de usar el nitrato como aceptor de electrones (Criddle *et al.*, 1990; Robertson & Kuenen, 1984). Además es de conocimiento general que las reacciones bioquímicas no solo ocurren por que sean termodinámicamente favorables, también existen consideraciones cinéticas como presencia, ausencia y cantidad de catalizadores adecuados (Willey *et al.*, 2010).

Un factor importante que puede contribuir al buen desempeño del consorcio en la degradación de Tween 80 es que el inóculo consiste de biopartículas de carbón que los microorganismos están colonizando. Investigaciones como la de Pereira *et al.* (2001) reporta que la biomasa granular es 10 veces más resistente a altas concentraciones de ácido oleico que la biomasa suspendida. Un posible factor benéfico puede ser el haber aclimatado previamente al consorcio al tensoactivo Tween 80 (Alves *et al.*, 2001).

Otras variables evaluadas en nuestros reactores batch se muestran en la tabla 14. el valor del pH fue estable durante los experimentos en todos los reactores. La remoción de materia orgánica (η_{DQO}) siguió el siguiente orden *Dn* (64%) > *M* (56%) > *Ab* (39%). Como se mencionó arriba, este resultado es importante porque el valor de η_{DQO} está relacionado con la total degradación de todo el compuesto Tween 80, no solo de los ácidos grasos.

Interesantemente, estos resultados siguieron la tendencia de la remoción de los ácidos grasos (Tabla 14, Fig. 16). La más alta producción de CH₄ ocurrió en el tratamiento M (con CO₂ como aceptor de electrones) mientras que la producción de metano más baja ocurrió en el tratamiento Ab. Estos resultados fueron consistentes con lo esperado, basado en el origen metanogénico del inóculo usado en este trabajo.

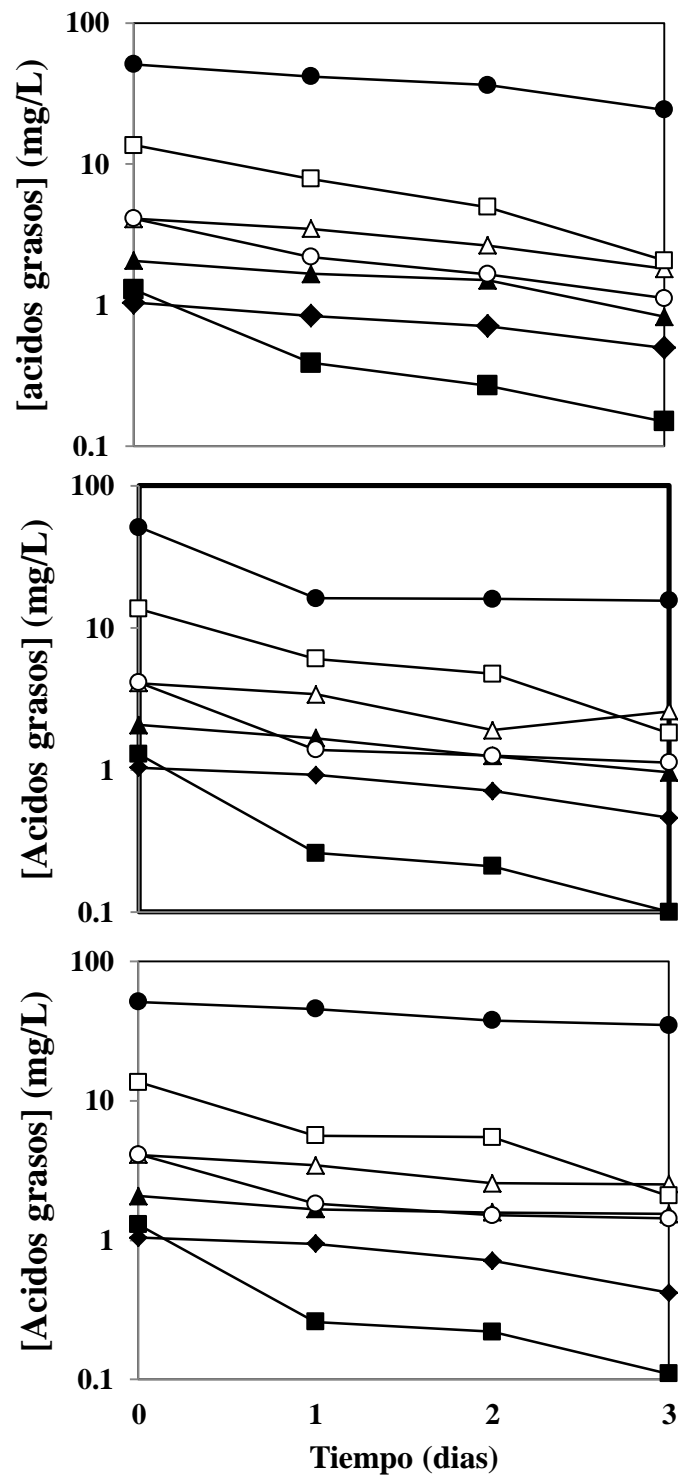


Figura 16. Dinámica de los ácidos grasos del Tween 80. Donde los reactores son: (a) M, (b) Ab y (c) Dn. Las concentraciones de los ácidos grasos esta expresada en base DQO. Nota: círculos negros es el ácido oleico, cuadrados blancos es el ácido linoleico, triángulos blancos es ácido palmítico, círculos blancos son ácidos esteáricos, triángulos negros corresponde al ácido palmitoleico, rombos negros es ácido Miristoleico y cuadrados negros corresponde al ácido Mirístico.

6.3 Degradación de percloroetileno asistida por nanopartículas

6.3.1 Síntesis de nanopartículas degradadoras de PCE:

Se sintetizaron las siguientes nanopartículas: FeS, Pd, Fe, FeCoPd, FePd, con la intención de encontrar a la NP que removiera mayor cantidad de PCE. La NP seleccionada tenía que ser una NP que no se oxidara tan rápido para que soportara las condiciones del sistema (flujos continuos de agua con el contaminante PCE). Además de que fuera fácilmente sintetizada y económica.

Los resultados muestran que las NPs más eficientes en remover PCE son las FePd, lograron remover 85% del contaminante PCE (200 mg/L). Las NPs de FeCoPd presentaron remociones cercanas a las primeras, del 79%. Las NPs de Fe removieron el 70% de PCE mientras que las de Pd el 65%. La remoción más baja se presentó con las NPs de FeS, que solo removieron 52% del PCE (Fig. 17)

La figura 18 nos muestra la remoción del contaminante a lo largo del tiempo, se puede apreciar que las NPs FeCoPd en las primeras horas presentan remociones ligeramente mayores a al tratamiento con NPs de FePd sin embargo al finalizar tenemos las NPs de FePd presentaron un remoción ligeramente mayor.

La tabla 12 nos muestra los metabolitos TCE, DCE y CV generados durante el proceso, como se puede observar los tratamientos con las NPs que más CV generaron fueron en primer lugar FeS con 7.12 y posteriormente FeCoPd con 1.87. En estos tratamientos la cantidad de los otros dos metabolitos TCE y DCE fue menor que en los demás tratamientos. El tratamiento con NPs FePd presenta una concentración baja y equilibrada en los tres metabolitos.

Tabla 12. Metabolitos producto de la degradación de PCE en las NPs

M.bolitos	Fes	Pd	Fe	FeCoPd	FePd
<i>TCE^a</i>	0.05 ± 0.02	0.25 ± 0.06	0.71 ± 0.05	0.09 ± 0.02	0.12 ± 0.3
<i>DCE^b</i>	0.07 ± 0.03	0.43 ± 0.12	0.36 ± 0.07	0.08 ± 0.02	0.31 ± 0.05
<i>CV^c</i>	7.12 ± 1.04	0.13 ± 0.07	0.76 ± 0.04	1.87 ± 1.37	0.11 ± 0.03

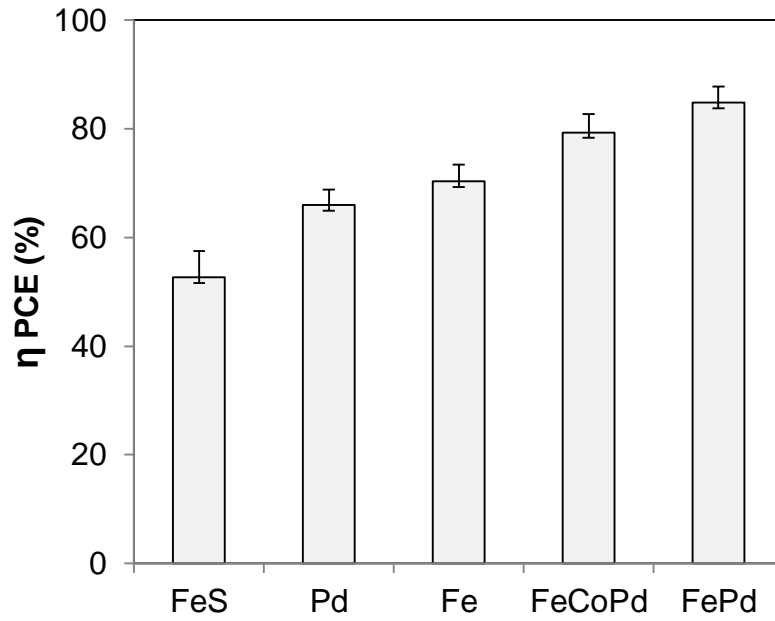


Figura 17. La eficiencia de remoción de PCE en las nanopartículas

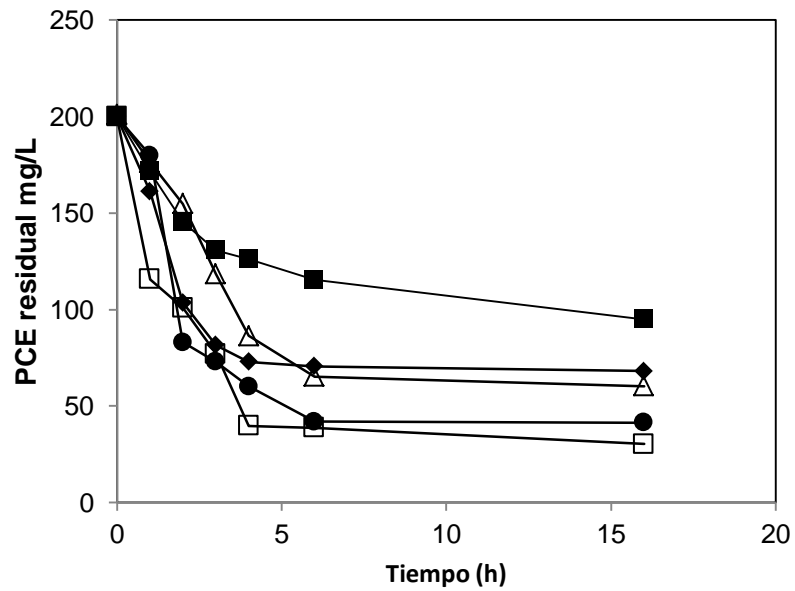


Figura 18. Dinámica de la remoción del PCE por las nanopartículas

6.3.2 Degradación de percloroetileno con nanopartículas bimetálicas Fe/Pd

El estudio de XRD mostro la estructura cristalina de las NPs Fe/Pd. Las imágenes de SEM mostraron que las NPs están dispersas homogéneamente y oscilan en un rango de 5 a 10 nm. Además el análisis con detector EDS confirmo la composición y proporciones de las NPs (Fig. 19).

La superficie BET de las NPs fue de 33, 84, 66 y 56 m²/g para los tratamientos FP0 al FP3 respectivamente. Parece ser que la unión de los elementos (Fe y Pd) que conforman las NPs tuvieron un efecto sinérgico donde el resultado fue un incremento de la BET en la NP conforme aumento la concentración de Pd.

Esta tendencia está en concordancia con los resultados reportados por Wang *et al.* (2009). Ellos deshalogenaron CCl₄ con partículas bimetálicas Fe/Pd, sus NPs tenían un promedio BET de 51 m²/g, parecida a la BET de nuestro tratamiento FP3 de 56 m²/g.

En contraste Kim *et al.* (2013) usaron dos diferentes concentraciones de Pd y no encontraron ninguna diferencia en la medida del área superficial, la cual fue de 31 m²/g promedio en sus NPs bimetálicas Fe/Pd, las cuales tenían formas controladas de cubos o esferas. Tal vez no pudieron apreciar una diferencia sustantiva entre ambas NPs debido a que la concentración de Pd (0.1 y 0.3%) era muy baja además de muy cercanas ambas concentraciones. La BET que reporta Kim *et al.* (2013) es tan baja como la de nuestras NPs que solo tenían hierro (33 m²/g).

En efecto, el patrón de los incrementos en la BET de las NPs observados por Wang *et al.* (2009) y nosotros es prometedora, porque ha sido reportado que mayores BET están relacionadas con mayores remociones de contaminante (Gunawardana *et al.*, 2011) debido a que esto permite un mayor contacto entre las NPs y el contaminante.

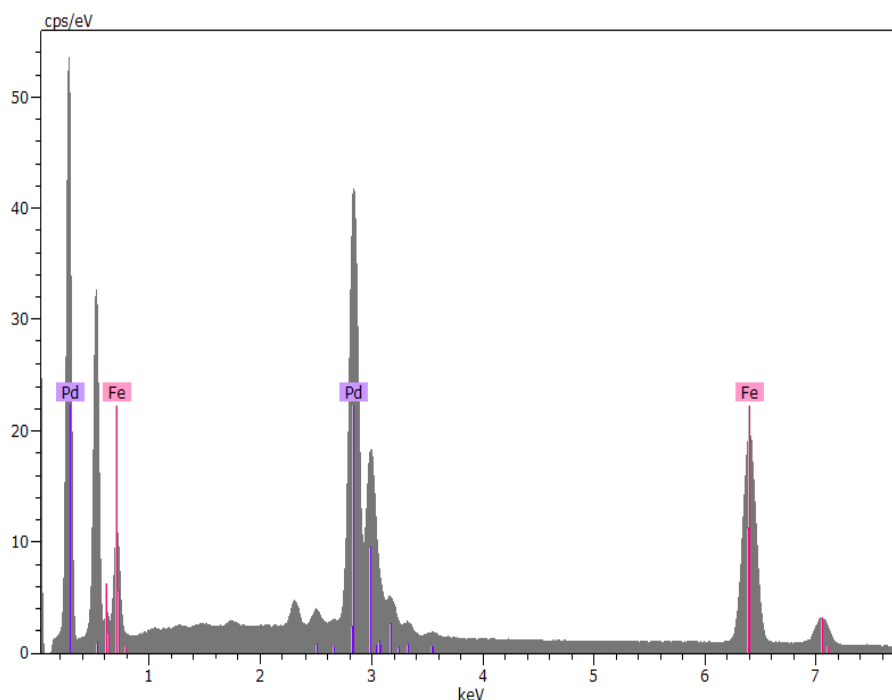


Figura 19. Espectro de energía dispersa (EDS) de las NPs en FP1

El tensoactivo tetra-n- butilamonio de bromuro (TBAB) tuvo un efecto positivo durante la síntesis de las NPs Fe/Pd. Se observó una diferencia significativa entre la integración de las NPs cuando el tensoactivo fue adicionado. La aglomeración de las NPs se redujo, estos resultados son similares a los observados por Dumbrava *et al.* (2005) el cual también utilizó TBAB y obtuvo NPs de ZnS pequeñas, esféricas y dispersas. La estabilidad de todas las NPs se mantuvo, como lo demostró el análisis de espectroscopia Raman, que no mostró capas de óxido después de tres semanas de almacenamiento con una atmósfera N_2 y $25^\circ C$.

Test de remoción de PCE

Los tratamientos de degradación de PCE fueron monitoreados durante 16 h (Fig. 20). La máxima remoción de PCE obtenida al final de las 16 horas fue del 85% para el tratamiento FP2, mientras que el FP1 logró 83%. FP3 presentó una remoción baja, 76% sin embargo la remoción más baja fue para el tratamiento que no tenía Pd, FP0, y removió solo el 47%. El Pd presentó un efecto positivo en la remoción de PCE.

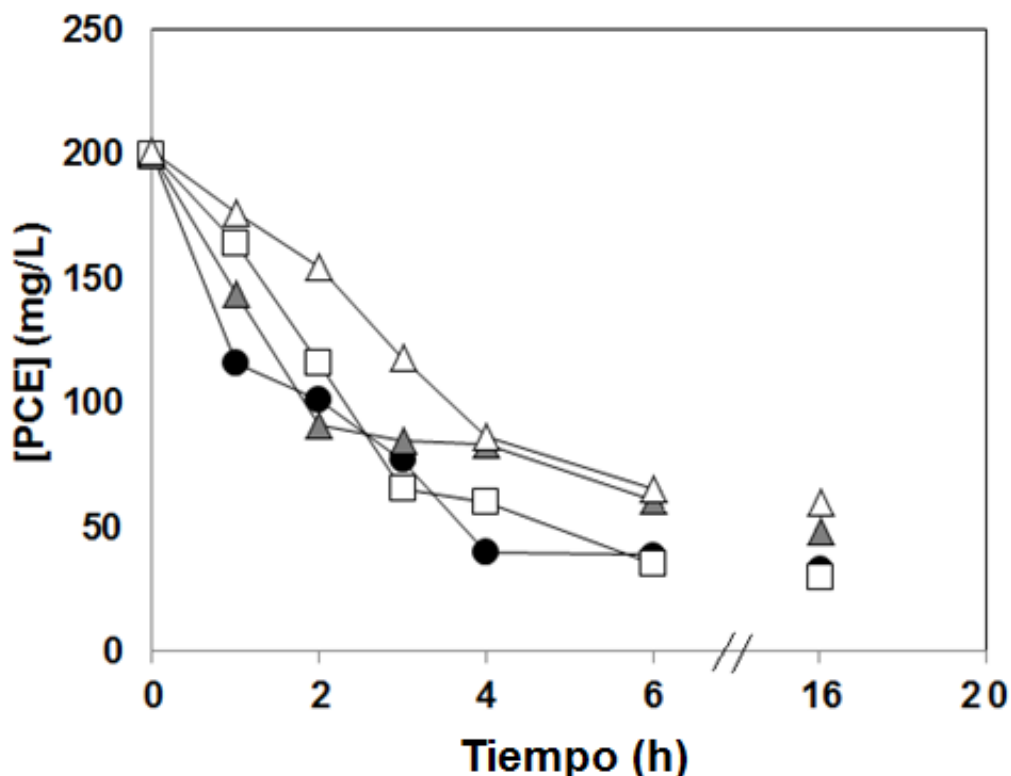


Figura 20. Dinámica de la concentración de PCE. Donde *FP0* es triángulos blancos, *FP1* es círculos negros, *FP2* es cuadrados blancos, *FP3* es triángulos negros. Las desviaciones estándar fueron menores que 3.4 mg/L

Las remociones después de cuatro horas fueron: 80% para el tratamiento *FP1*, mientras que los tratamientos *FP2* y *FP3* presentaron 79 y 58% respectivamente. Los resultados mostraron que durante las primeras cuatro horas el mejor tratamiento fue el *FP1* el cual contiene la mayor cantidad de Pd. Tal vez el Pd, el cual es reconocido como absorbente de los átomos de hidrogeno que se liberan durante la remoción del PCE, pudo haber contribuido a prevenir la pérdida de reactividad del hierro (Venkatachalam *et al.*, 2008, Shih *et al.*, 2011).

Los principales metabolitos generados por la deshalogenación del PCE, fueron TCE y DCE (tabla 13, Fig. 21). El tratamiento *FP3* liberó la concentración más alta de TCE (5.03 mg/L) a las 4 horas del tratamiento, sin embargo al final del experimento la concentración de TCE liberada fue pequeña, alrededor del 0.32 mg/L.

Tabla 13. Tasas de remoción de PCE con nanopartículas de Fe/Pd

μ , mass ratio Fe/Pd (-)	r_v (mgPCE _{rem} /L)	r_m (mgPCE _{rem} /(mg _{NP} .h))	r_{Pd} (mgPCE _{rem} /(mg _{Pd} .h))	PCE efic. remov. 6 h (%)	PCE efic. remov. 16 h (%)
1:1 (0.5)	38.11 ± 1.14	0.007 ± 0.002	0.014 ± 0.501	81.24 ± 2.88	83.57 ± 3.10
2.3:1 (0.32)	38.21 ± 2.14	0.007 ± 0.005	0.023 ± 0.033	82.14 ± 2.44	85.88 ± 2.77
9:1 (0.10)	29.87 ± 1.24	0.005 ± 0.003	0.052 ± 0.044	69.44 ± 1.11	76.73 ± 1.78

Notas: *NP* nanopartículas estandar. La r_v and the other specific rates were calculated from data of the first 6h

Las NPs que se utilizaron en los experimentos, fueron analizadas para determinar si absorbían PCE y cuanto de este contaminante podían retener. La concentración retenida fue menor al 5% cantidad que fue restada a las unidades experimentales.

Las concentraciones de PCE absorbidas fueron 0.007, 0.009, 0.010 mg y 0.0010 PCE/mg NPs para FP1, FP2, FP3 y FP0 respectivamente. La concentración de metabolitos absorbido y retenidos en las NPs estuvo por debajo del límite de detección. La tasa de remoción volumétrica (r_v) y la específica (r_m) se muestran en la tabla 13. Los tratamientos FP1 y FP2 mostraron valores de r_v similares, estos valores son un 30% mayor que lo encontrado en el tratamiento FP3. Interesantemente la r_{Pd} aumento cuando la cantidad de Pd en las NPs disminuía. Esto sugiere que el Pd en pequeña proporción fue más eficiente durante la remoción de PCE.

Los resultados son alentadores, el tratamiento FP3 tuvo una r_{Pd} de 0.052 mgPCE_{rem}/(mg Pd.h) mientras que Ma & Wu. (2008) los cuales trabajaron con 100 mg/L de TCE reportaron remociones del 77% y una r_{Pd} de 0.001. Smuleac *et al.* (2011) determino una r_{Pd} de 0.015 mg TCE_{rem}/mg Pd para los test de remoción de 30 mg/L de TCE, usando té verde como agente reductor para sintetizar las NPs.

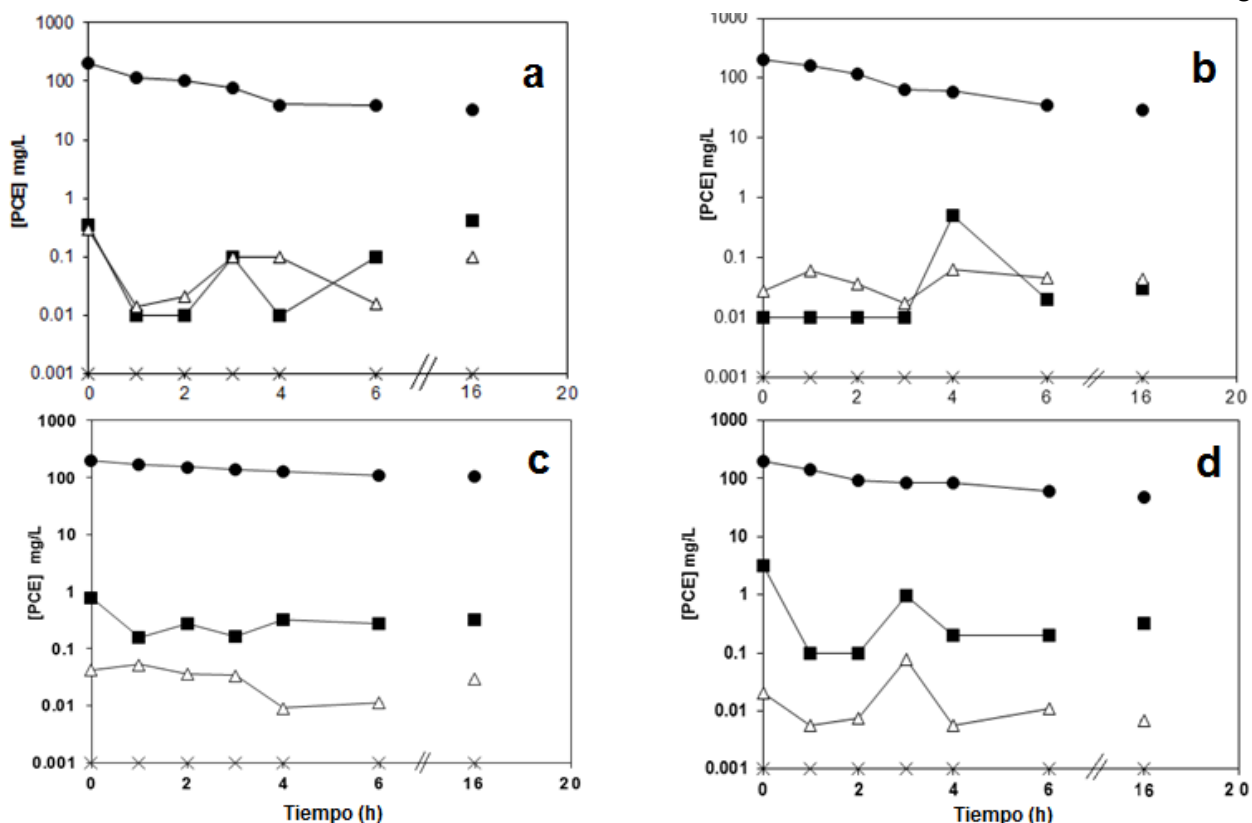


Figura 21. Concentración de PCE y metabolitos. Donde (a) *FP1*; (b) *FP2*; (c) *FP3*, y (d) *FP0*, nota: *PCE*, círculos negos; *TCE*, cuadrados negos; and *DCE*, triángulos blancos.

Se realizó un análisis económico para determinar el costo de la síntesis de las diferentes NPs y evaluar si existía un ahorro interesante en usar concentraciones bajas de Pd como se utilizó en *FP2* y *FP3*.

La figura 22 muestra que el tratamiento *FP3* se presentó un ahorro del 40% comparado con el tratamiento *FP1*, mientras que en el tratamiento *FP2* hubo un ahorro del 15% comparado con el *FP1*.

Para determinar cuál proceso sería el mejor, buscando eficiencia y ahorro. El proceso de 16 h es aceptable y se podría utilizar *FP2* o *FP3*, mejor el último, dado que la eficiencia de remoción del PCE es buena.

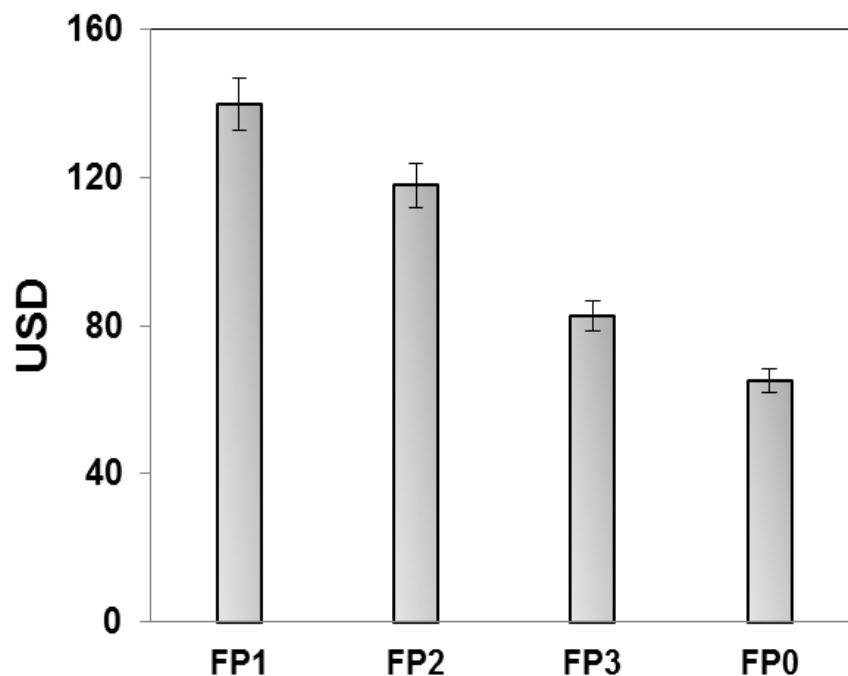


Figura 22. Costos estimados de la síntesis de las NPs Fe/Pd

Además se podría utilizar el FP3 por que los tres tratamientos a esa hora son similares pero el ahorro es más significativo. Si existe la necesidad de procesos de remoción más rápidos, se tendría que utilizar el FP1 o FP2, aunque siempre FP2 sería la opción más económica.

6.3.3 Nanomembrana de Fe para la remoción de percloroetileno

Los resultados de la síntesis de las nanopartículas embebidas en la matriz de algodón nos muestran que las NPs que fueron sintetizadas con 0.25 M de la sal precursora $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ lograron remover el 94 % del contaminante PCE (90 mg/L) en 10 horas de tratamiento. Las NPs con 0.15 M de la sal precursora, removieron el 80% del PCE, como se puede apreciar en la Fig. 23

Durante el experimento de remoción de PCE, no se observaron metabolitos como TCE, DCE y CV para ninguna de las dos membranas. Los metabolitos productos de la degradación de PCE son un problema de salud, en algunos casos estos metabolitos resultan más tóxicos que el mismo PCE .

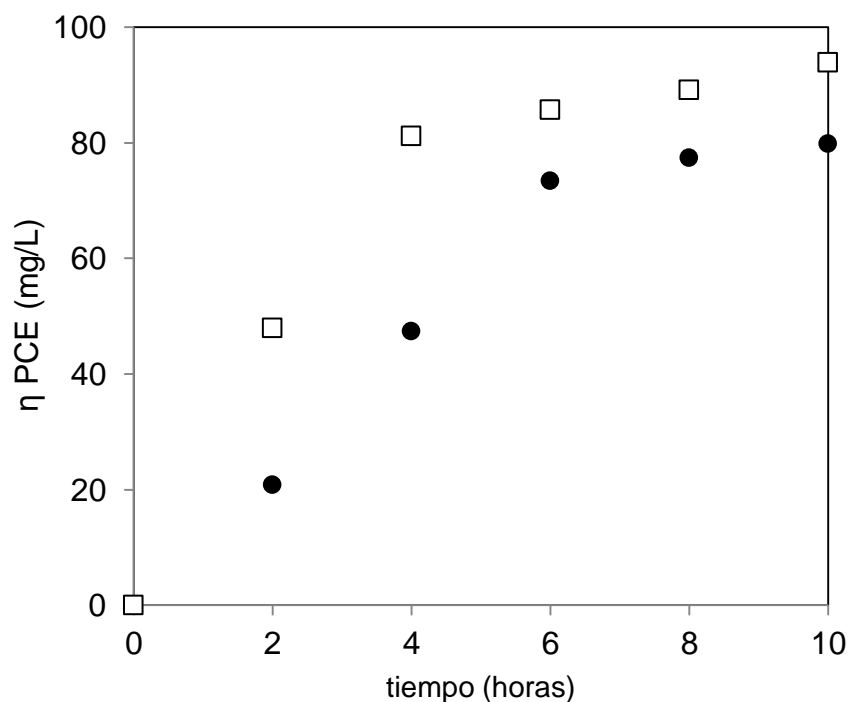


Figura 23. Eficiencia de PCE removido por medio de la nano-membrana de hierro

Debido al mejor desempeño de la nano-membrana con la sal precursora de 0.25 M de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ los posteriores análisis de caracterización (Fig. 24, 25, 26 , 27) se realizaron únicamente en esta membrana.

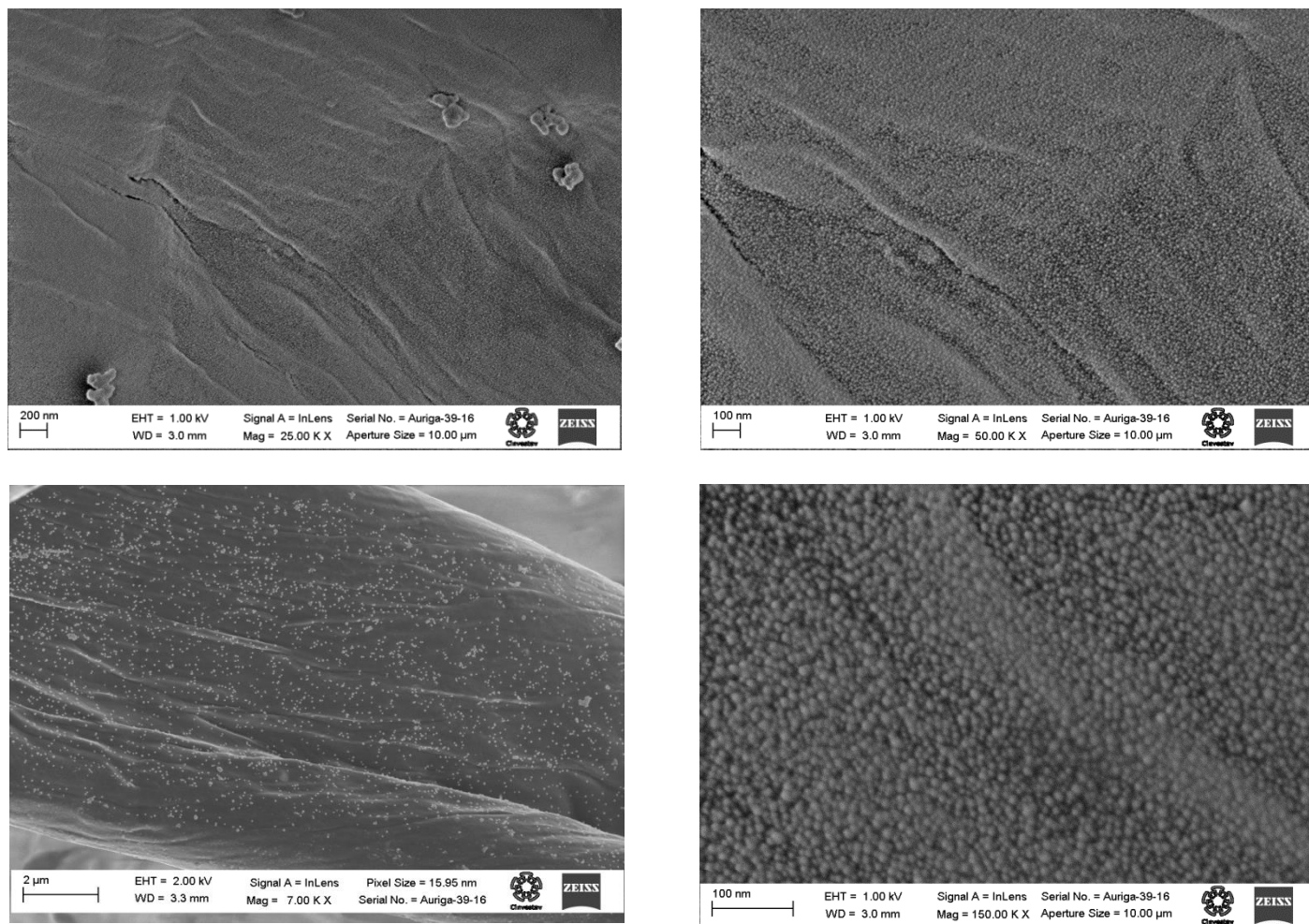


Figura 24. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la nano membrana de hierro.

Las imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) nos muestran que las NPs, quedaron inmersas en las fibras de algodón de la membrana (Fig. 24). El tamaño de las NPs osciló de los 2 a los 12 nm.

Estas imágenes (Fig. 24) muestran que las NPs quedaron dispersas a lo largo de las fibras de algodón, lo que probablemente se debió al uso del tensoactivo SDS durante su síntesis. La dispersión homogénea de las NPs probablemente influyó positivamente a que la membrana pudiera remover eficientemente al contaminante PCE.

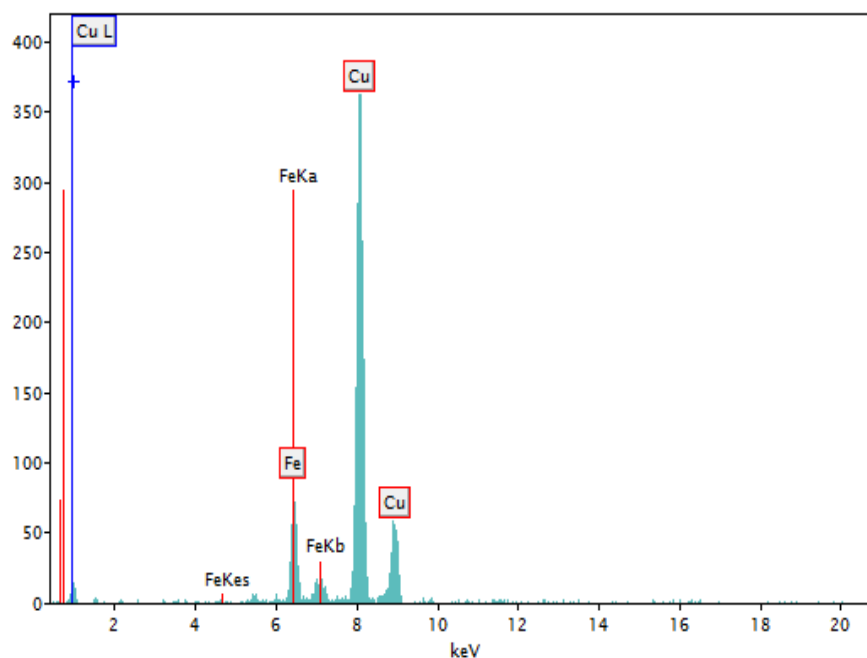


Figura 25. Espectro de energía dispersiva (EDS) de la nano-membrana

Las NPs de hierro dentro de las fibras de algodón están protegidas del medio ambiente, lo que evita que estén tan expuestas al oxígeno, esto puede retrasar su oxidación y permitir que las NPs sean más reactivas al contaminante y/o su uso pueda ser más duradero en los biorreactores.

Los análisis con el detector de energía dispersiva del microscopio electrónico de barrido (EDS) (Fig. 25) confirmaron la presencia del hierro como único componente de la nano – membrana. Además de que los resultados de rayos X (XRD) demostraron la estructura y cristalinidad del hierro presente en la nano-membrana, como se puede apreciar en la Fig. 21 con picos característicos de este metal a 44.66° , 65.16° y 82.6° encontrados en el patrón XRD

Las imágenes obtenidas con el microscopio de transmisión eléctrico con contraste de campo oscuro o también llamado contraste Z nos permite apreciar las partículas metálicas de forma individual como se observa en la Figura 28 o un conjunto de ellas y apreciar que las NPS son esféricas.

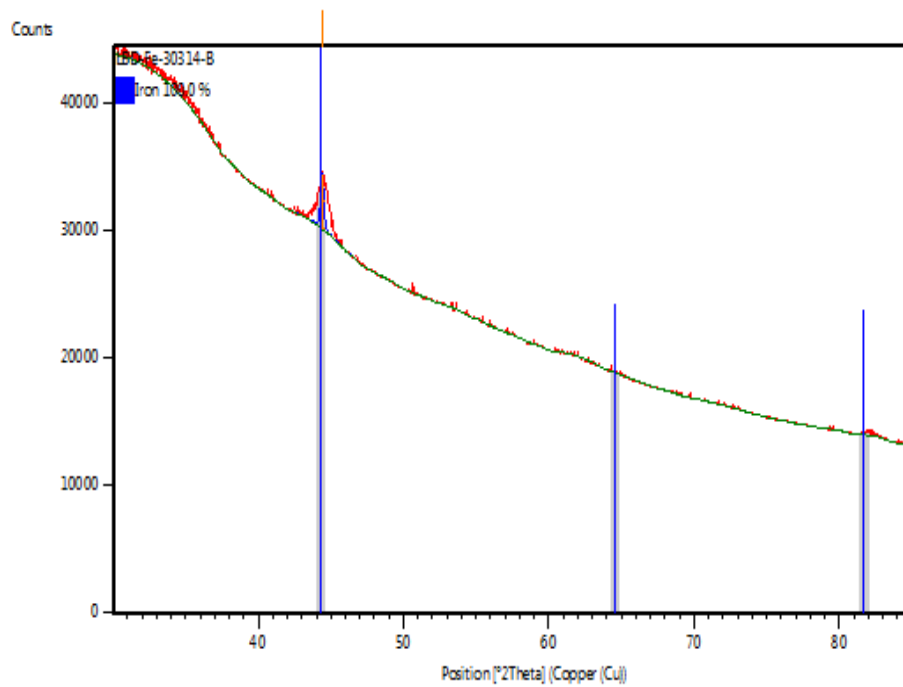


Figura 26. Patrón de rayos X (XRD) de la nano membrana

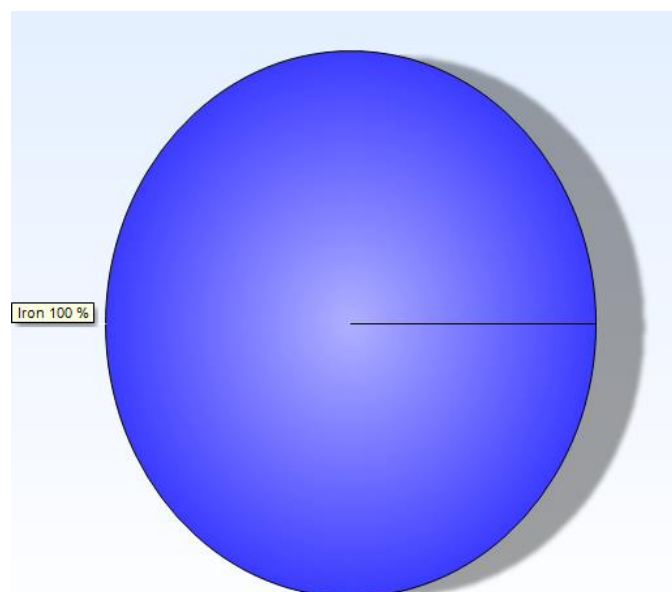


Figura 27. Composición de la nano membrana de hierro

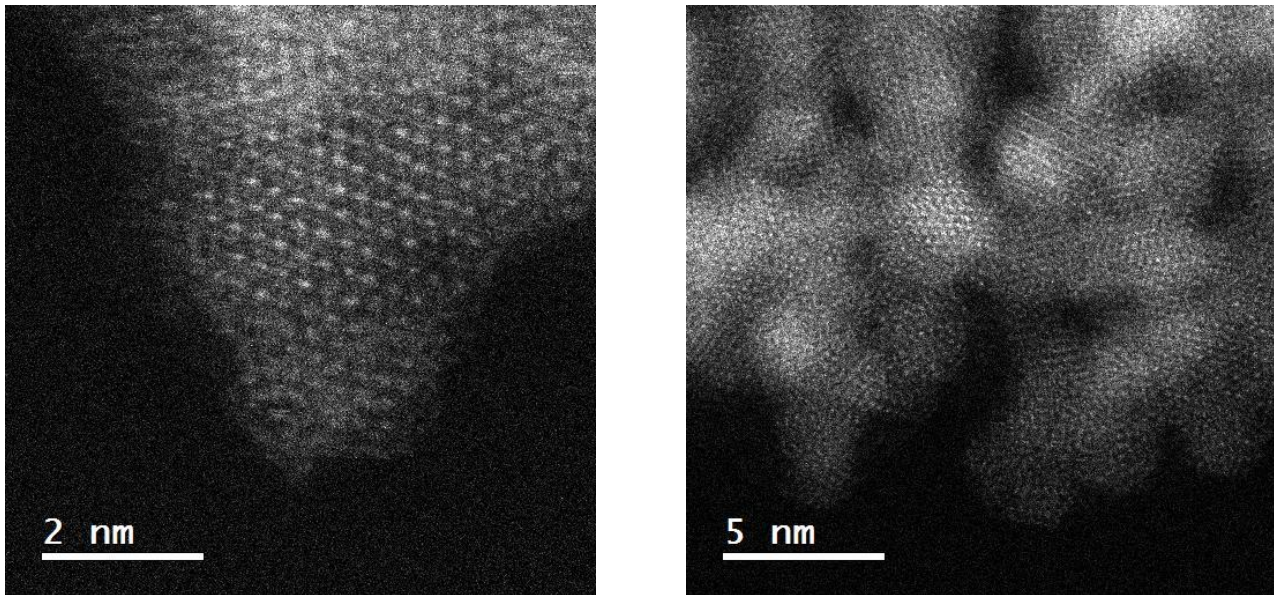


Figura 28. Imágenes de microscopía de transmisión eléctrica de la nano membrana

El hierro es el mejor elemento conocido hasta hoy para la remoción de clorados, ha sido ampliamente utilizado en la remoción de PCE y sus metabolitos (Lee & Batchelor, 2002). Sin embargo el problema de la oxidación de este elemento en los tratamientos ambientales sigue siendo un problema (Elsner *et al.*, 2008,).

La solución más utilizada hasta el momento es acoplarle otro metal para que la corrosión sea más lenta (Harendra & Vipulanandan, 2008), pero los costos se incrementan debido a la necesidad del segundo metal. La nano membrana de hierro podría ser una forma eficaz de utilizar el poder reductor del hierro, pero utilizando al algodón como una forma de protección contra la exposición del metal al oxígeno del ambiente. Esto podría retrasar la oxidación del hierro y alargar la vida de la membrana.

Otro problema es la recuperación de las nanopartículas que son utilizadas en problemas ambientales. La membrana podría proteger del lavado y pérdida del material reactivo, evitando problemas ambientales futuros.

La nano-membrana, después de 10 hr que duro el experimento de remoción batch, presentó un color rojizo característico de la oxidación (Fig. 29 y 30).

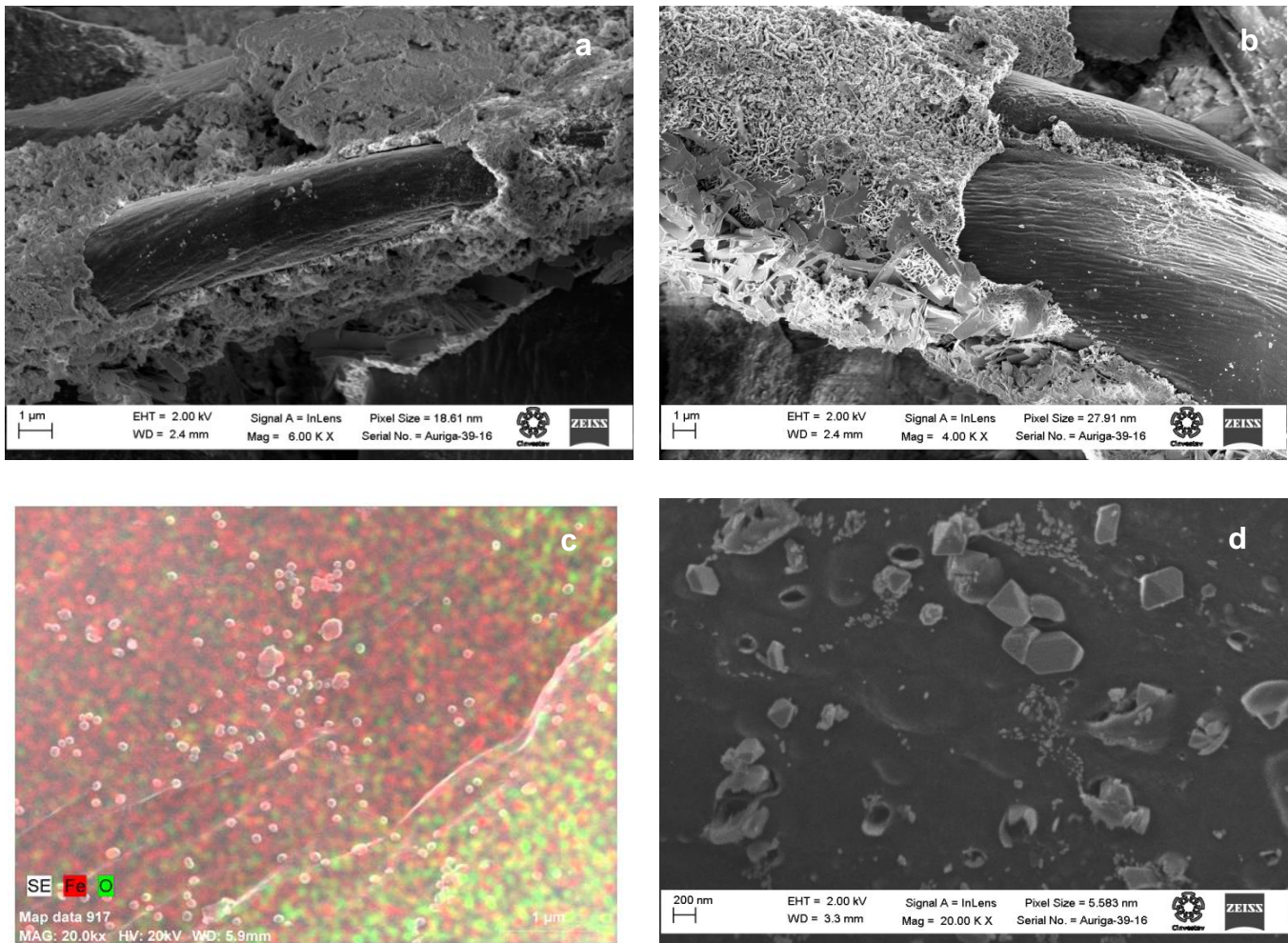


Figura 29. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la nano-membrana. Donde el cuadro a) representa una fibra con oxido, el cuadro b) fibra con óxidos, c) mapeo químico de la membrana y d) óxidos formados en la muestra.

Las imágenes SEM tomadas después del tratamiento muestran que a cada fibra de algodón se le hizo una capa que podría ser de óxidos (Fig 29 a y b). La imagen del mapeo (Fig. 29 c) tomada nos muestra como el material entro en contacto con oxígeno probablemente del agua y el resultado fue la oxidación del hierro Fig. Además se encontraron imágenes de partículas con la forma característica piramidal de óxidos de hierro como magnetita (Fig. 29 d).

La membrana se lavó para eliminar residuos orgánicos y se sometió a un tratamiento térmico como el descrito en materiales y métodos (350 °C, H₂). experimento anterior. El PCE fue removido (Fig. 30) rápidamente en 10 horas

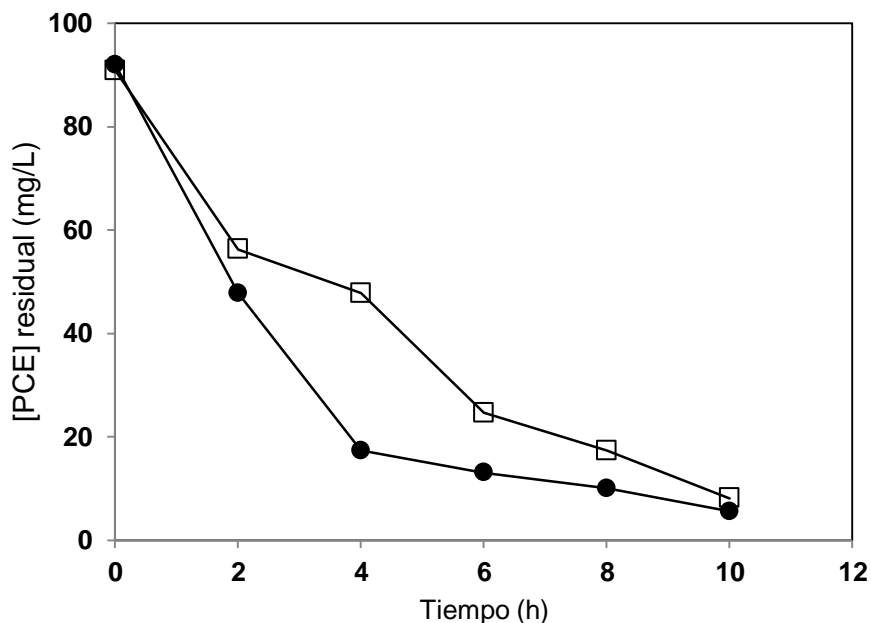


Figura 30. Comparación de la remoción de PCE entre las nano-membranas. Dónde: círculos negros es la nano-membrana en su primera vuelta y cuadrados blancos es la nano-mebrana en su segunda vuelta.

La membrana mostró una vez más su poder reductor en un experimento batch con la misma cantidad de PCE (90 mg/L) que en el Los resultados muestran que la membrana fue capaz de remover el PCE con éxito, se alcanzó un 91% de remoción en 10 hr (Fig. 30).

La presencia de metabolitos como TCE, DCE y CV fue nula durante el proceso de remoción. Las remociones alcanzadas en las dos ocasiones fueron muy similares 94 y 91 % en la primera y segunda ocasión respectivamente.

Al término de la segunda remoción, la membrana ya estaba muy débil y se comenzó a desintegrar durante los lavados previos al tratamiento térmico para lograr reactivar la membrana por una tercera ocasión.

Filtro nanoparticulado en los reactores de lecho fluidizado

La nano membrana de hierro demostró ser eficiente para la remoción de PCE (actividad 8) y ahora era momento de acoplarla a los reactores de lecho fluidizado y ver si era funcional.

El primer problema a superar fue la creación de un filtro que soportara a la nano membrana de forma restirada para que tuviera toda el área de contacto de su superficie para remover al contaminante clorado. Se logró con éxito la creación de un prototipo de filtro, el cual se acoplo a los reactores antes del recirculador.

Los resultados obtenidos fueron positivos, la membrana logro remover todo el PCE (330 mg/L) en 5 h al término de esta primer vuelta de remoción se adicionó una concentración similar de PCE y el reactor siguió operando continuamente. Se logró remover la totalidad del contaminante después de 16 h.

La membrana seguía completa y estable dentro del filtro, por lo que se adicionó una tercera carga similar de PCE y el reactor siguió operando en continuo, esta vez la membrana tarda más tiempo en remover la totalidad del compuesto. Después de 24 h se logró obtener el 100% de remoción del PCE. (Fig. 31 y 32).

Durante las dos primeras vueltas de la membrana no se obtuvieron metabolitos secundarios de la degradación del PCE como lo es TCE, DCE y CV. Sin embargo en la última vuelta comenzamos a observa la presencia de submetabolitos

La remoción del compuesto PCE en el bioreactor con nano membrana en comparación con el bioreactor sin ayuda alguna herramienta abiótica como la nano mebrana

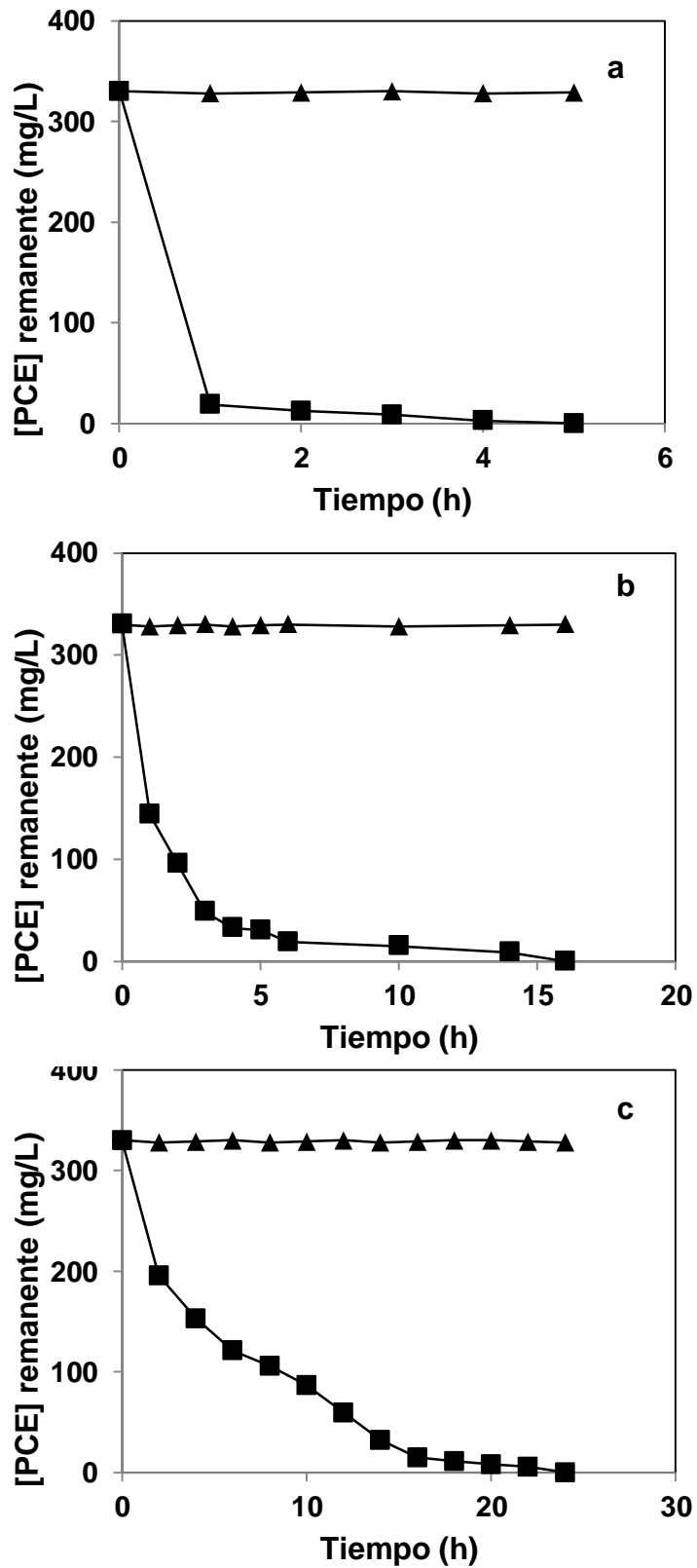


Figura 31. Remoción de PCE en el reactor con filtro nanoparticulado

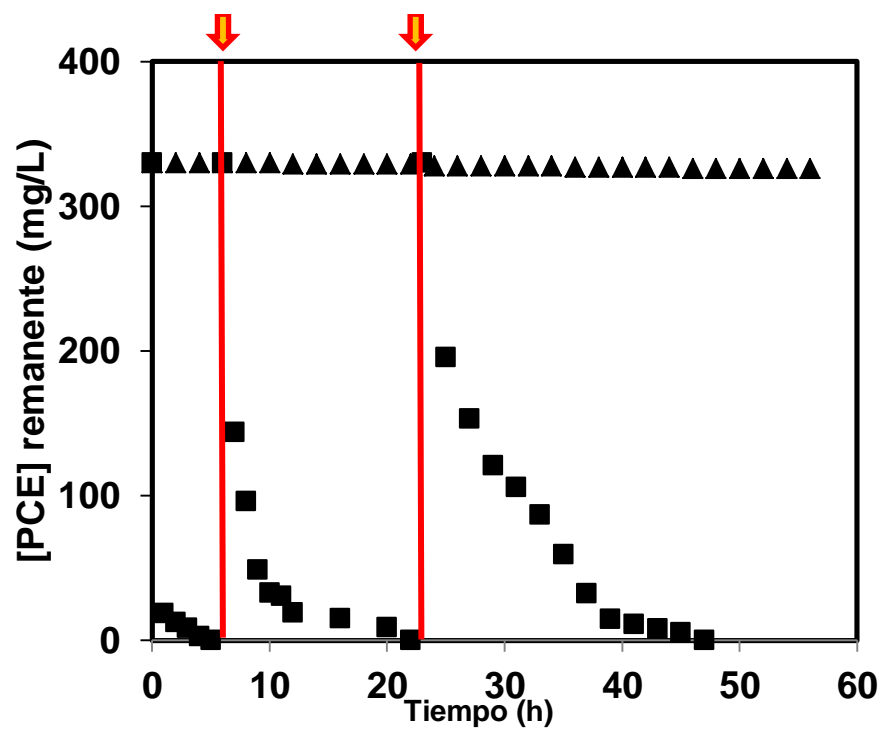


Figura 32. Dinámica de la remoción de PCE en el reactor con filtro nano

6.3.4 Bionano-biopartículas de magnetita para la remoción de percloroetileno

Los resultados de rayos X (XRD) mostraron que las biopartículas provenientes de una sal precursora a 0.25 M eran una mezcla de óxidos de hierro como magnetita y hematita Fig. 34 y 35. Las muestras que tenían una concentración de 0.15 M de sal precursora no formaron una mayoría de estructuras cristalinas, el patrón XRD muestra los picos característicos de la sal precursora (Fig. 33)

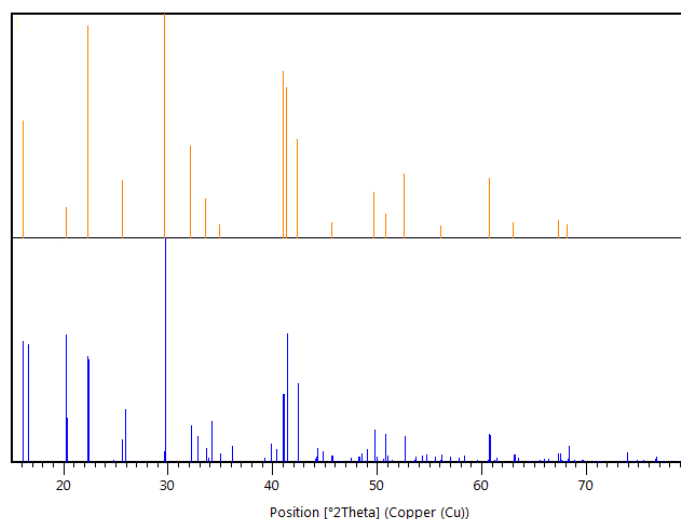


Figura 33. Patrón de Rayos X (XRD) de los tratamientos 0.15 M

Las imágenes del microscopio electrónico de barrido (SEM) muestran a las NPs esféricas en un rango amplio de tamaños que van desde los 5 nm hasta los 50 nm en los tratamientos con 0.25 M en ambos tipos de sales precursoras FeCl_3 o $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, como podemos observar en la Fig. 36 cuadros a y b.

Las muestras con 0.15 M de sal precursora Fig. 36 cuadro b y c muestran agregados de las sales FeCl_3 o $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, y algunas nanopartículas que están aglomeradas y oscilan en los 200 nm sin embargo son la minoría.

En las imágenes de la Fig. 36 cuadros e y f podemos encontrar unas estructuras alargadas de aprox. 200 nm y que están sobre estructuras circulares que podrían ser microorganismos o alguna partícula del carbón de la muestra.

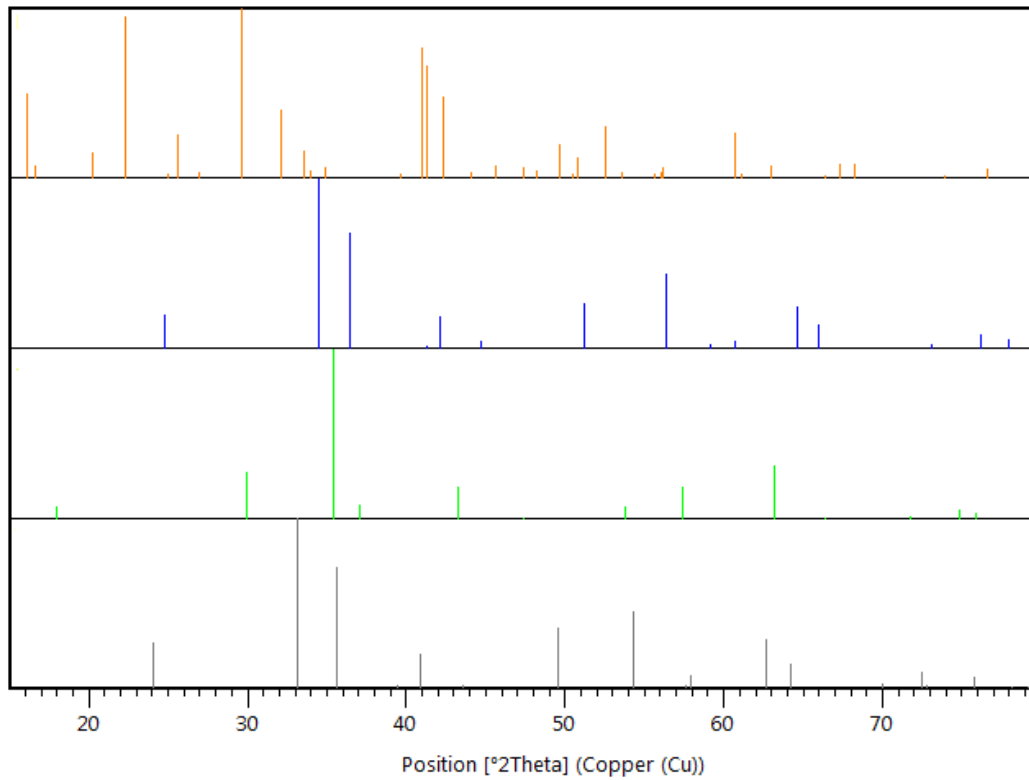


Figura 34. Patrón de Rayos X (XRD) de las bionano- biopartículas

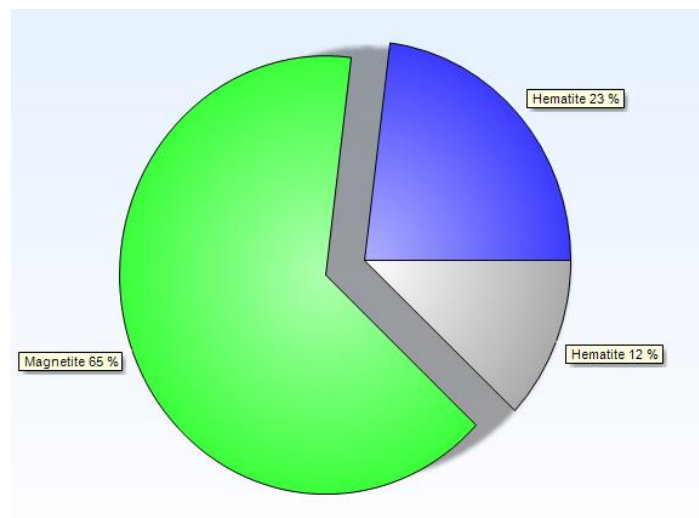


Figura 35. Composición de las bio nano biopartículas

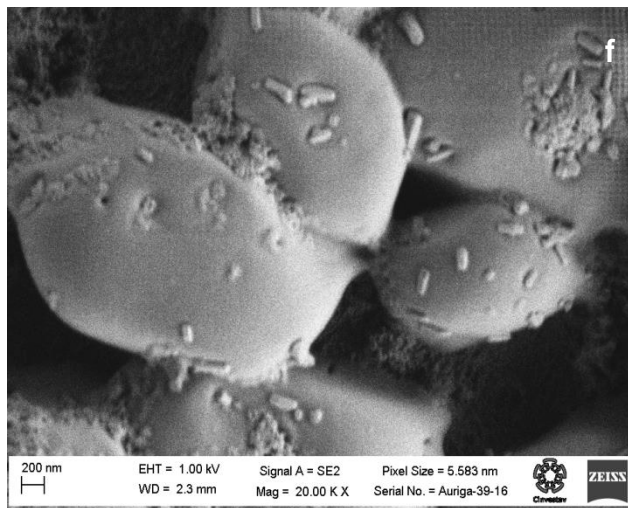
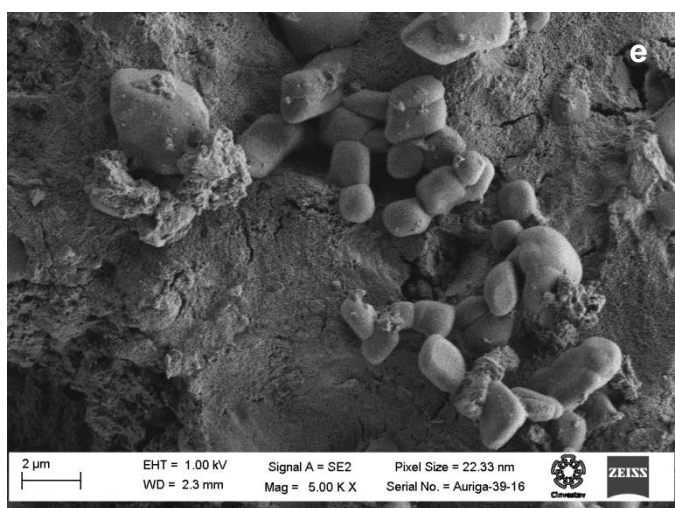
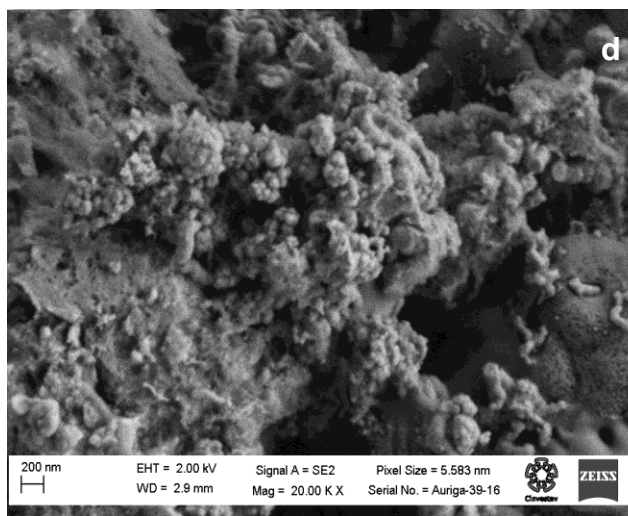
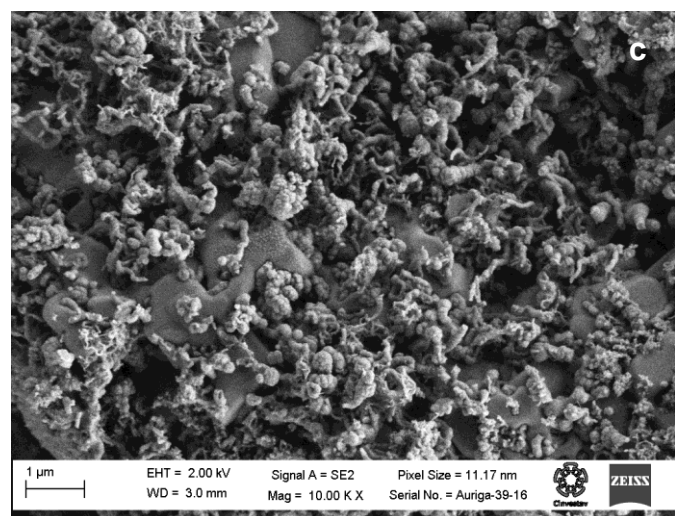
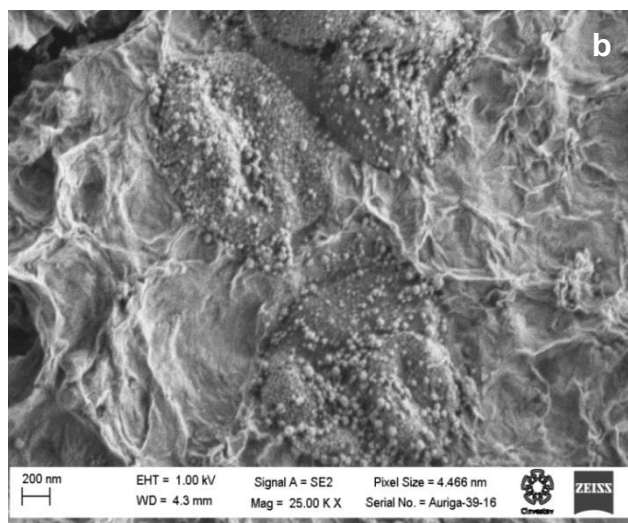
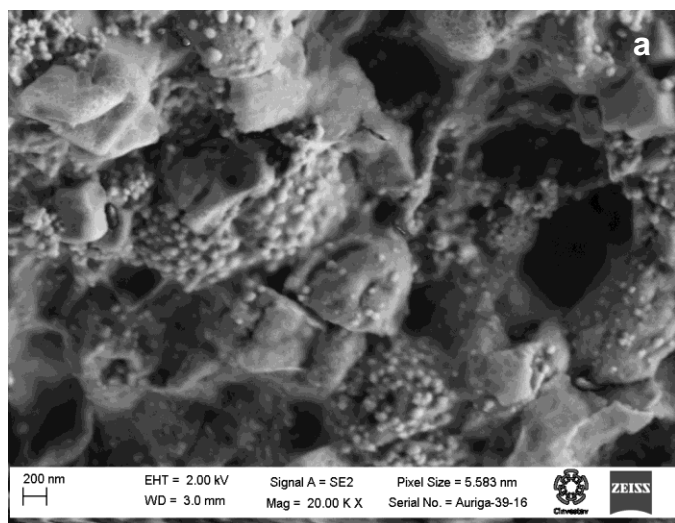


Figura 36. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las bio nano

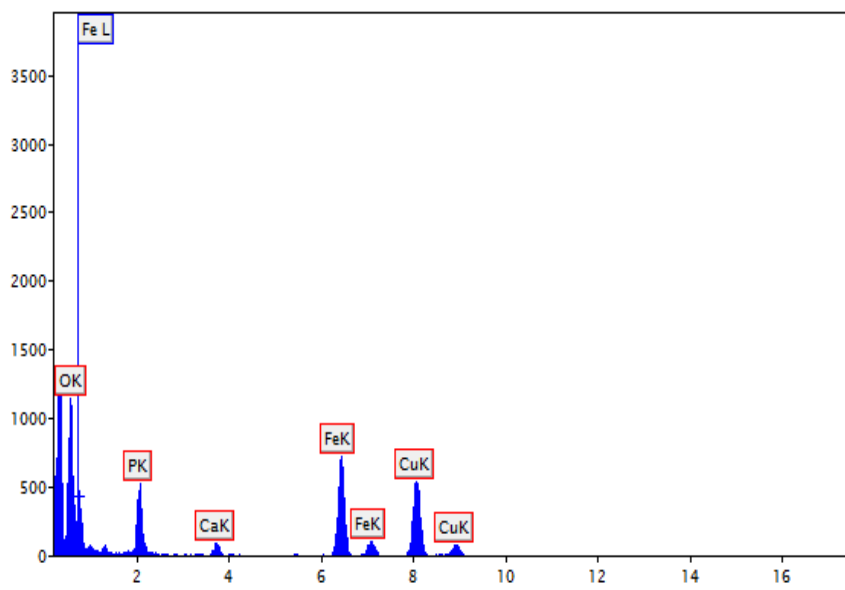


Figura 37. Espectro de energía dispersiva (EDS) de las bio nano

Los análisis con el detector de energía dispersiva del microscopio electrónico de barrido (EDS) (Fig. 37) confirmaron la presencia del hierro y oxígeno como únicos componente de las bio nano biopartículas.

En cuanto a los experimentos de remoción de contaminantes el consorcio pudo exitosamente utilizar los dos tipos de sales para formar NPs activas reductoras de PCE. La concentración adecuada para la síntesis de las NPs fue 0.25 M. La remoción de PCE fue más eficiente utilizando a FeCl_3 como sal precursora, después de 4 días la remoción de PCE fue del $99\% \pm 0.4$. las NPs biosintetizadas con $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ removieron $93\% \pm 0.1$ de PCE

Por otro lado, las unidades control que solo tenían biopartículas con el consorcio deshalogenante pero no sales precursoras de NP, solo removieron un $38\% \pm 1.5$ y presentaron metabolitos secundarios como TCE, DCE y VC. Las unidades control que contenían solo a las metales precursores solo removieron un $4\% \pm 1.2$ con $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ y 8.16 ± 1.8 con FeCl_3 . Los tratamientos con una concentración de 0.15 M de la sal precursora mostraron una remoción del $48\% \pm 1.8$ usando $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ y $45\% \pm 0.78$ usando FeCl_3 . Parece ser que la remoción del PCE en estos controles fue la sinergia de las sal más el efecto deshalogenante del consorcio (Fig. 38).

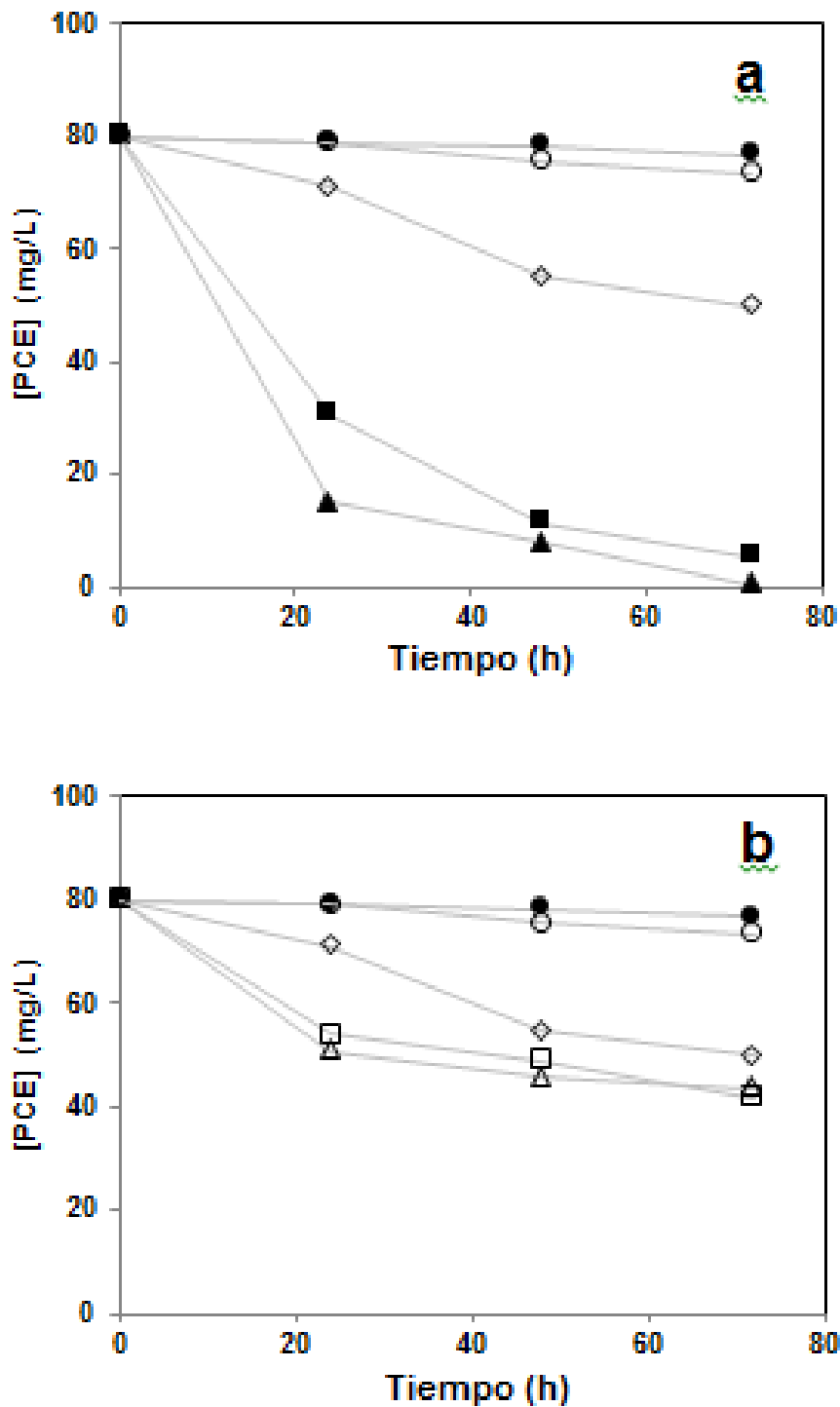


Figura 38. Remoción de PCE por las bio nano biopartículas. Donde a) es el tratamiento 0.25 M y el cuadro b) es el tratamiento 0.15 M. Los círculos son el tratamiento solo con la sal precursora FeCl₃ y círculos blancos el tratamiento solo con la sal precursora Fe(NO₃)₃, rombos es el tratamiento solo con biopartículas, cuadros negros es el tratamiento completo, biopartículas Fe(NO₃)₃ y los triángulos es biopartículas mas FeCL₃

La figura 39 nos muestra imágenes del microscopio de transmisión eléctrica donde se aprecian a las partículas circulares, su arreglo atómico y como puede que estén dentro de un polímero que ocasiona que se aglomeren.

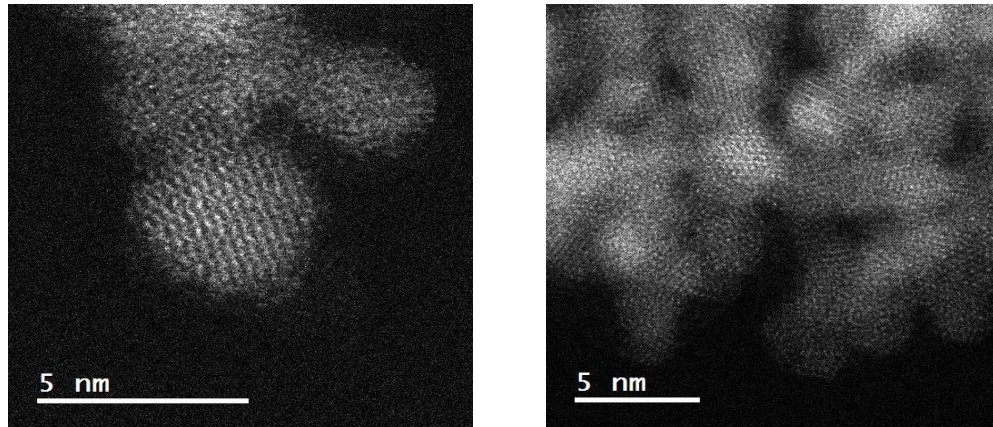


Figura 39. Imágenes de microscopía de transmisión eléctrica de las bio nano

Después de que las bio-nano Biopartículas son sometidas a los experimentos de remoción de PCE fueron analizadas con EELS y se pudo observar que la forma del hierro había cambiado y ahora era F_2O_3 . Un óxido que tiene menos capacidad reductora de PCE (Fig. 40).

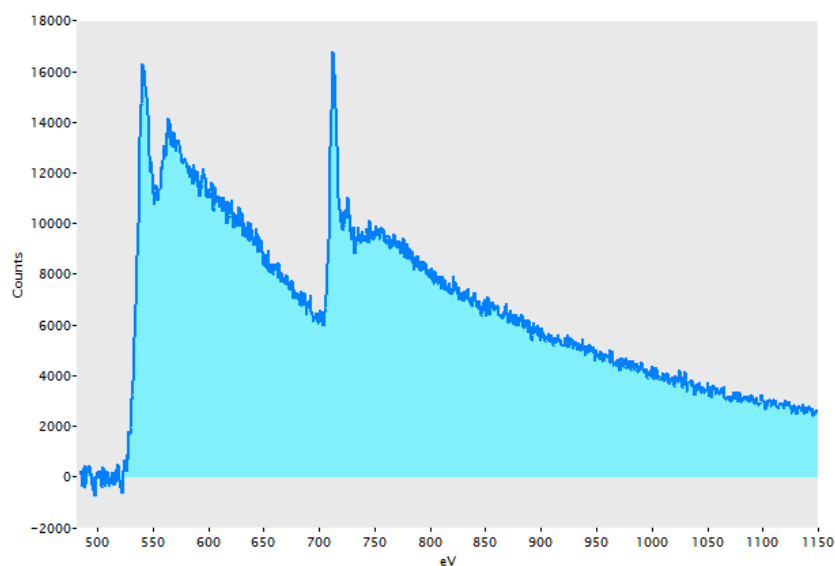


Figura 40. Análisis de espectroscopía electrónica de pérdidas de energía (EELS) de las bio nano después de remover PCE

8-Conclusiones

Los reactores de lecho fluidizado presentaron remociones de PCE mayores al 90% en un rango de concentración del contaminante de 80 a 393 mg/L. Al aumentar la concentración del contaminante el consorcio microbiano presentó tiempos de aclimatación directamente proporcionales a la cantidad de contaminante adicionado. El tiempo de aclimatación más largo fue de 150 días para la concentración de 393 mg/L de PCE.

El consorcio microbiano se enriqueció en microorganismos deshalogenantes como *Dehalobacter spp.*, *Desulfurospirillum spp.*, *Desulfitobacterium spp.*, y *Dehalococcoides spp* además de las arqueas *Methanosarcinas spp.*

Los microorganismos presentes en los reactores fueron capaces de utilizar al tensoactivo Tween 80 como fuente de carbono y remover a los ácidos grasos presentes en la molécula de Tween 80.

Los reactores de lecho fluidizado que tenían acoplado el filtro de hierro y arena presentaron mayores remociones de PCE en todos los periodos además la cantidad de *Dehalococcoides spp* encontrada en estos reactores fue mayor probablemente a la estimulación del metal.

Las herramientas abióticas más prometedoras para acoplar al sistema fue la nano-membrana de hierro la cual remueve más del 90% del PCE en 10 h sin generar metabolitos secundarios y las bionano biopartículas de magnetita que logran remover PCE sin utilizar agentes reductores químicos que contaminan el medio ambiente, además de ser una forma económica y sustentable para generar nanopartículas.

9 Bibliografía

- Aktas O. and Cecen F. (2006). Bioregeneration of activated carbon: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59(4): 257-272.
- Albino JD and Nambi I. (2009). Effect of biosurfactants on the aqueous solubility of PCE and TCE. *Journal of Environmental Science and Health*. 44:14 1565-1573.
- Alves, M.M., Mota-Vieira J.A., Alvares-Pereira R.M., Pereira A., Mota M. (2001). Effect of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed bed reactors. Part 1: Biofilm growth and activity. *Water Res.* **35**: 255-263
- Angelidaki I. and Ahring B.K. (1992). Effects of free long chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 37: 808-812.
- Antizar-Ladislao B. (2010). Bioremediation: working with bacteria, elements. *Environmental Science Technology* 34 293-302.
- Anzola-Rojas, Oliveira Netto y Zait. (2008). Actividad metanogénica específica en un reactor anaerobio-aerobio aplicado al tratamiento de agua residual doméstica. *Interciencia* 33.
- APHA (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater* 21st edn., American Public Health Association, Washington, D.C.
- Artiola F. Janick and Ramírez D. Mónica. (2006). Solventes clorados contaminantes en los acuíferos de Arizona. *SciTransfer*.
- ASTDR 2003
- Aulenta F., Majone M., Verbo P., Tandoi V. (2002). Complete dechlorination of tetrachloroethene to ethene in presence of methanogenesis and acetogenesis by an anaerobic sediment microcosm. *Biodegradation* 13:411-424
- Bautista F., Sanz R., Molina C., González N., Sánchez D. (2009). Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. *International Biodeterioration y Biodegradation* 63 913-922
- Becker JG. (2006). A modeling study and implications of competition between *Dehalococcoides ethenogenes* and other tetrachloroethene respiring bacteria. *Environ Sci Technol* **40**: 4473-4480.
- Bereded-Samuel Y, Petersen J, Skeen R. (1996). Effect of perchloroethylene (PCE) on methane and acetate production by a methanogenic consortium. *Appl Biochem Biotechnol* **1**:915-922.
- Canovas-Diaz M., Sanchez-Roig M.J., Iborra J.L. (1991). Myristic and oleic acid Degradation by an acclimated anaerobic consortia: synergistic behavior. In *Biomass for Energy, Industry and Environment*. 6th E.C. Conference, eds G. Grassi, A. Collina and H. Zibetta. Elsevier Applied Science, London UK. Pp. 580-584.
- Carroll D., Sleep B., Krol M., Boparai H., Kocur C. (2013). Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resource*. 51 pp. 104-122.
- Cintra 5 UV-VIS Double Beam Operation Manual. (1998). GBC Australia: 84 pp
- Criddle T, DeWitt D and McCarty. (1990). Reductive dehalogenation of carbon tetrachloride by *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3247-3254.
- Cross K.M., Lu Y., Zheng T., Zhan J., McPherson G.L., John V.T. (2014). Water Decontamination Using Iron and Iron Oxide NPs. Street, Sustich, Duncan and Savage. *Nanotechnology Applications for Clean Water*, 2nd Edition. Elsevier Inc.
- Drake, H. L. (ed.) (1994). *Acetogenesis*. Chapman and Hall, Nueva York
- Dumbrava A., Ciupina V., Pordan G., Rom. (2005) *Journ Phys* 50 831.
- Edgcomb V.J., McDonald R., Devereux R., Smith D. (1999). Estimation of bacterial cell numbers in humic acid rich salt marsh sediments with probes directed to 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1516-23.

- Elsner M., Chartrand M., Vanstone N., Couloume G., Lollar B. (2008). Identifying abiotic chlorinated ethane degradation: Characteristic isotope patterns in reaction products with nanoscale zero-valent iron. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5963-5970.
- El-Temsah Y.S., Joner E. J. (2013). Effects of nano sized zero valent iron (nZVI) on DDT Degradation in soil and its toxicity to collembola and ostracods. *Chemosphere* 92 pp. 131-137.
- EPA. (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment EPA/630/P-03/001F, Mar 2005
- EPA. (2003). National Primary Drinking Water Standards. Office Water (4606M); EPA 816-F-03-016.
- EPA. (1994). National Primary Drinking Water Standards. *Office of Water (4606M); EPA 816-F-03-016; www.epa.gov/safewater.*
- Ergüder T.H and Demirer G.N. (2005). Investigation of granulation of a mixture of suspended anaerobic and aerobic cultures under alternating anaerobic/microaerobic/aerobic conditions. *Process Biochemistry* 40: 3732-3741.
- Escamilla-Alvarado. C.; Poggi-Varaldo, H.M.; Ponce-Noyola, M.T. (2013). Use of organic waste for the production of added-value holocellulases with *Cellulomonas flavigena* PR-22. *Waste Manage. Res.* 31(8): 849-858. DOI 10.1177/0734242X13492841.
- Estrada-Vazquez C, H, Kato M T; Rodríguez-Vázquez R, Esparza-García F, Poggi-Varaldo H. M. (2001). Oxygen exposure resistance in suspended anaerobic sludge. *Interciencia* 26: 547-553.
- Estrada-Vázquez C, Macarie H, Kato M T; Rodríguez-Vázquez R, Esparza-García F, Poggi-Varaldo H M (2003). The effect of the supplementation with a primary carbon source on the resistance to oxygen exposure of methanogenic sludge. *Water Science and Technology* 48 (6): 119-124.
- Fernandez-Alba A., Letón P., Rosal R., Dorado M., Villar S., Sanz J. (2009) Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. Informe de Vigilancia Tecnológica.
- Ferry, J. G. (ed.) (1993). Methanogenesis. Chapman and Hall, Nueva York.
- Fischer, S.G. and Lerman L.S (1980). Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77(8): 4420 – 4424.
- Frischer M. E., Danforth M.A., Healy N., Saunders F. M. (2000) Whole – cell versus total RNA extraction for analysis of microbial community structure with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes in salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7): 3037-43
- Futagami T., Goto M., Furukawa K. (2008). Biochemical and Genetic Bases of Dehalorespiration. *The Chemical Record* 8:1-12
- Garant H, and Lynd L. (1996). Perchloroethylene Utilization by Methanogenic Fed-Batch Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 57/58.
- Garibay-Orijel C., B. K. Ahring, N. Rinderknecht-Seijas & H. M. Poggi-Varaldo. (2006). A simple model for simultaneous methanogenic-denitrification systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 81(2): 173-181.
- Gerritse J, Drzyzga O, Kloetstra G, Keijmel M, Wiersum LP. (1999). Influence of different electron donors and acceptors on dehalorespiration of tetrachloroethene by *Desulfitobacterium frappieri* TCE 1. *Appl. Environ. Micro-biol.* 65:345-69.
- Godia F., and Sola C. (1995). Fluidized Bed Bioreactors. *Biotechnol Prog.* 11, 479-497.
- Gunawardana B, Singhal N, Swedlund P. (2011). Degradation of chlorinated phenols by zero valent iron and bimetals of iron: A review. *Environ Eng Res* 4:187-203.
- Hadibarata T and Tachibana S. (2009) Enhanced Chrysene Biodegradation in Presence of a Synthetic Surfactant. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry.* 3001
- Hanaki K., Matsuo T, Nagase M. (1981). Mechanisms of inhibition caused by long chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnol. Bioeng.* 23:1591-1610.

- Haque K.A., Pfeiffer R.M., Beerman M.B., Struewing J.P., Chanock S.J., Bergen A.W. (2003). Performance of high throughput DNA quantification methods. *Bmc Biotechnology* 3
- Harada H, Uemura S and Momonoi K. (1994). Interaction between sulfate-reducing bacteria and methane-producing bacteria in UASB reactors fed with low strength wastes containing different levels of sulfate. *Water Research*. 28 (2) 355-367.
- Harendra S. and Vipulanandan, C. (2008). Degradation of high concentrations of PCE solubilized in SDS and biosurfactant with Fe/Ni bi-metallic particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 322(1-3): 6-13
- He F., Zhao D., Paul C. (2010). Field assessment of carboxymethyl cellulose stabilized iron *NPs* for in situ destruction of chlorinated solvents in source zones. *Water Research* 44 pp. 2360 – 2370
- Herrera-López, D.; Ríos-Leal, E.; Ponce-Noyola, M.T.; Esparza-García, F.; García-Mena, J.; Poggi-Varaldo, H.M. (2007). A comparison of two fluidized bed bioreactors with combined electron acceptors for removal of high concentrations of perchloroethylene. In: Sass, B.M. (Editor). *Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds-2006*. Battelle Press, Columbus, OH. ISBN 1-57477-157-4.
- Holliger C, Hahn D, Harmsen H, Ludwig W, Schumacher W. (1998). *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol*. 169:313-21.
- Horvath A. (1982). *Halogenated hydrocarbons, solubility-miscibility with water* dekker. New York, NY, EEUU. 920p.
- Hussein J. (2008). *Microcosms and field bioremediation studies of perchloroethene (PCE) contaminated and groundwater*. Tesis doctoral. Universidad estatal de Kansas. 221
- Ince O, Anderson G.K & Kasapgil B. (1995). Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system. *Water Research*. 29 (1) 349-355.
- ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council), (2011). *Environmental Molecular Diagnostics Fact Sheets*. EMD-1. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Environmental Molecular Diagnostics Team
- Jawed M., and Tare V. (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity test. *Water SA* 25(3)
- Kao CM, Chen SC, Liu JK, Wu MJ. 2001. Evaluation of TCDD biodegradability under different redox conditions. *Chemosphere* 44(6):1447-1454.
- Karri S, Sierra-Alvarez R, Field JA. (2005). Zero valent iron as an electron donor for methanogenesis and sulfate reduction in anaerobic sludge. *Biotechnol Bioeng* 92:810-819.
- Kim S, Kim C, Lee J, Kim J, Lee H, Moon S (2013) Performance of shape controlled Pd nanoparticles in the selective hydrogenation of acetylene. *Journal of Catalysis* 306:146-154.
- Kittlmann S and Friedrich M. (2008). Identification of novel perchloroethene-respiring microorganisms in anoxic river sediment by RNA-based stable isotope probing. *Environ. Microbiol*. 10(1):31-46.
- Kresyzig E. (1972). *Introduction to mathematical statistics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Kristensen G. H. & E. P. Jorgensen. (1992). Characterization of functional microorganism groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Water Science and Technology*. 25(6): 43-57

- Kulkarni G., Kridelbaugh DM., Guss AM., Metcalf WW. (2009). Hydrogen is a preferred intermediate in the energy-conserving electron transport chain of *Methanosarcina barkeri*. *PNAS* 106(37):15915-15920
- Lalman J.A., Bagley D.M. (2001). Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water Res.* **35**:2975-2983.
- Lebron C., Acheson C., Dennis P., Druar X., Wilkinson J., Ney E., Major D., Petrovskis E., Barros N., Yeager C., Löffler F., Ritalahti K., Hatt J., Edwards E., Duhamel M., Chan W. (2008). An overview of current approaches and methodologies to improve accuracy, data quality and standardization of environmental microbial quantitative PCR methods. Technical information report. NAVFAC ESC
- Lee & Batchelor. (2002). Abiotic reductive dechlorination of chlorinated ethylenes by iron bearing soil minerals. 1 pyrite and magnetite. *Environ. Sci. Technol.* (36) 5147-5154
- Lee D., Kim E., Chang. (2005). Effect of Tween surfactant components for remediation of toluene contaminated groundwater. *Geosciences Journal.* **9**(3):261-267
- Lee J., Lee T.K., Löffler F.E., Park J. (2011). Characterization of microbial community structure and population dynamics of tetrachloroethene dechlorinating tidal mudflat communities. *Biodegradation* **22** : 687-98
- Lee T., T. Tokunaga, A. Suyama & K. Furukawa. (2001). Efficient dechlorination of tetrachloroethylene in soil slurry by combined use of an anaerobic *Desulfitobacterium* sp strain Y-51 and zero-valent iron. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 92(5): 453-458
- Li B., Zhu J., Zhan F. (2014). Removal of p-chloronitrobenzene from groundwater: Effectiveness and degradation mechanism of a heterogeneous nanoparticulate zero-valent iron (NZVI) induced fenton process. *Chem Engineering Jou.* 1-32.
- Liang H., Newell C, Rao S. (2010). Decision & Management Tools for DNALP Sites: Optimization of Chlorinated Solvent Source and Plume Remediation Considering Uncertainty. ESTCP Project ER-200704.
- Liang X., Dong Y., Kuder T., Philp R., Butler E. (2007). Distinguishing abiotic and biotic transformation of tetrachloroethylene and trichloroethylene by stable carbon isotope fractionation. *Environ Sci Technol.* 41(20):7094-7100.
- Lin Y., Weng CH., Chen FY. (2008). Effective removal of AB24 dye by nano/micro size zero valent iron. *Separation and Purification Technology* 64, pp.26-30.
- Lyew D, Tartakovsky B, Manuel M-F, Guiot S.R. 2002. A microcosm test for potential mineralization of chlorinated compounds under coupled aerobic/anaerobic conditions. *Chemosphere* 47 695-699.
- Ma C. and Wu Y. (2008). Dechlorination of perchloroethylene using zero valent metal and microbial community. *Environ Geol.* 55 p. 47-54.
- Major D.W., McMaster M.L., Cox E.E.(2002). Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethane. *Environ. Sci. Technol.* 36: 5106 – 5116.
- Marzorati M., Balloi A., De Ferrara F., Corallo L., Carpani G., Wittebolle L., Verstraete W., Daffonchio D. (2010). Bacterial diversity and reductive dehalogenase redundancy in a 1,2-dichloroethane-degrading bacterial consortium enriched from a contaminated aquifer. *Microb. Cell Factories.* **9**: 1-12
- Mateju V., S. Cizinska, J. Krejci & T. Janoch. (1992). Biological Water Denitrification - A Review. *Enzyme and Microbial Technology.* 14(3): 170-183.
- Matturro B., Tandoi V., Rossetti Simona. (2013). Different activity levels of *Dehalococcoides mccartyi* revealed by FISH and CARD-FISH under non-steady and pseudo-steady state conditions. *New Biotechnology.* 30(6):756-762

- Mazur C.S., Jones W.J., Tebes-Stevens C. (2003). H₂ consumption during the microbial reductive dehalogenation of chlorinated phenols and tetrachloroethene. *Biodegradation* 14:285-295.
- Montgomery, D.C. (1991). *Design and analysis of experiments*. 3rd. ed., John Wiley & Sons, New York.
- Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R. 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environmental International* 37 1362-1375.
- Moebus, O., Teuber, M., Eur, (1982). *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15 pp 194-197.
- Mohan VS, Shailaja S, Krishna MR, Reddy KB, Sarma PN. 2006. Bioslurry phase degradation of di-ethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. *Process Biochem.* 41(3):644-652.
- Mohn W.W. and Tiedje J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol Reviews*, 56: 482 – 507.
- Moreno-Medina C, Bretón-Deval L, Ríos-Leal E, Barrera-Cortés, Rinderknecht-Seijas N, Poggi-Varaldo HM. (2011). Incremento de la Solubilización de Percloroetileno con un Tensoactivo no Iónico. *Interciencia.* 36 no 2.
- Mrafkova L. et al 2003. Preliminary evaluation of inhibitory effects of some substances on aerobic and anaerobic treatment plant biomasses. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 17 (3):243-247
- Muyzer G. and Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(1):127-141.
- Nemec T. and Jernerjc K. 2002. Influence of Tween 80 on lipid metabolism of an *Aspergillus niger* Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 101: 229-238
- Nijenhuis I., Andert J., Beck K., Kastner M., Diekert G., Richnow H. 2005. Stable isotope fractionation of tetrachloroethene during reductive dechlorination by *Sulfurospirillum multivorans* and *Desulfitobacterium* sp. Strain PCE-S and abiotic reactions with cyanocobalamina. *Appl Environ Microbiol.* 71 (7):3413-9.
- Novak J.T. and Carlson D.A. (1970). The kinetics of anaerobic long chain fatty acids degradation. *J. Water Pollut. Control. Fed.* 42:1932-1943.
- Ortega J. Sbarato D. Sbarato V. y Campos M. 2000. Propuesta marco normativo regulatorio del funcionamiento de tintorerías ecológicas. Maestría en gestión para la integración regional. Centro de información y documentación regional, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ouattara A.S, Assih E.A., Thierry S., Cayol J., Labat M., Monroy O., Macarie H. (2003). *Bosea minatitlanensis* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an anaerobic digester. *Int. J. System. Evolutionary Microbiol.* 53:1247-1251
- Patrolecco L, Capri S, De Angelis S, Polesello S, Valsecchi. (2004). Determination of endocrine disrupting chemicals in environmental solid matrices by extraction with a non-ionic surfactant (Tween 80). *Journal of Chromatography A*, 1022 1-7.
- Phenrat, T., Saleh N., Sirk K., Tilton RD., Lowry GV. (2007). Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environmental Science and Technology.* 41 pp. 284-290.
- Poggi-Varaldo H.M., Valdes L., Esparza-Garcia F., Fernandes-Villagomez G. (1997). Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids and municipal solid waste. *Water Sci. Technology* 35:197-204.
- Poggi-Varaldo H. M. & J. A. Oleszkiewicz. (1992). Anaerobic Cocomposting of Municipal Solid-Waste and Waste Sludge at High Total Solids Levels. *Environmental Technology.* 13(5): 409-421.

- Poggi-Varaldo HM, Moreno-Medina C, Galíndez-Mayer J, Ponce-Noyola MT, Esparza-García FJ, Ríos-Leal E, Juárez-Ramírez C, Rinderknecht-Seijas NF. (2009). A review of zero-valent metals and biological treatment for the removal of chlorinated aliphatic compounds. *New Biotechnol.* 25: 255-256
- Prak DL and Pritchard P. (2002). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons dissolved in Tween 80 surfactant solutions by *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505. *Can. J. Microbiol.* 48:151-158.
- Quintero JC, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. (2005). Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere.* 61(4):528-536.
- Reyna-Velarde R. (2005). Evaluación comparativa de la remoción de compuestos alifáticos clorados en reactores de ambientes combinados. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N (Cinvestav). Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Tesis de Maestría. México D.F: -76.
- Ripley L. E., W. C. Boyle & J. C. Converse. (1986). Improved Alkalimetric Monitoring for Anaerobic- Digestion of High-Strength Wastes. *Journal Water Pollution Control Federation.* 58(5): 406-411.
- Robertson L.A., Kuene J.G. (1984). Aerobic denitrification: A controversy revived. *Arch. Microbiol.* 139:351-354.
- Roman IS., Alonso ML., Bartolome L., Galdames A., Goiti E., Ocejo M., Moragues M., Alonso R.M., Vilas J.L. (2013). Relevance study of bare and coated zero valent iron NPs for lindane degradation from its by product monitorization. *Chemosphere.* 93 pp. 1324-32.
- Rosenthal, H., Adrian, L., Steiof, M. (2004). "Dechlorination of PCE in the presence of Fe enhanced by a mixed culture containing two *Dehalococcoides* strains." *Chemosphere* 55: 661-669.
- Sánchez M., A. Mosquera-Corral, R. Méndez & J. M. Lema. (2000). Simple methods for the determination of the denitrifying activity of sludges. *Bioresource Technology.* 75(1): 1-6.
- Shcherbakova V.A., Laurinavichius K.S., Akimenko V.K. (1999). Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. *Chemosphere* 39:1861-1870.
- Shin M, Choi H, Kim D, Baek K. (2008). Effect of surfactant on reductive dechlorination of trichloroethylene by zero-valent iron. *Desalination* 223:299-307.
- Siggins A., Enright A.M., O'Flaherty V. (2011). Methanogenic community development in anaerobic granular bioreactors treating trichloroethylene (TCE)-contaminated wastewater at 37°C and 15°C. *Water Res.* 45: 2452-62
- Smets B, Pritchard P. (2003). Elucidating the microbial component of natural attenuation. *Curr Opin Biotechnol.* (14) 283-8.
- Smuleac V, Varma R, Sikdar S, Bhattacharyya D (2011) Green synthesis of Fe and Fe/Pd bimetallic NPs in membranes for reductive Degradation of chlorinated organics. *Journal of Membrane Science* 379:131-137
- Su Y.P., Li XQ., Zhang WX., Wang HP. (2007). A method for the preparation of stable dispersion of zero valent iron NP. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 308 pp. 60-66.
- Tosco T., Papini MP., Viggi CC., Sethi R. (2014). Nanoscale zerovalent iron particles for groundwater remediation: a review. *Journal of Cleaner Production.* 77 pp. 10-21.
- Tsuneda S, Nagano T., Hoshino T., Ejiri Y., Noda N., Hirata A. (2003). Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Research.* 37, 20 pp. 4965-4973.

- Venkatachalam K., Arzuaga X., Chopra N., Gavalas V. G., Xu J., Bhattacharyya D., Hennig B., Bachas L. G. (2008). Reductive dechlorination of 3,3,4,4 tetrachlorobiphenyl (PCB77) using palladium or palladium/iron *NPs* and assessment of the reduction in toxic potency in vascular endothelial cells. *Journal of Hazardous Materials*. 159 pp. 483-491.
- Wagener S., and Schink B. (1988). Fermentative degradation of nonionic surfactants and polyethylene glycol by enrichment cultures and by pure cultures of homoacetogenic and propionate forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:561 – 565.
- Wang C, Zhang Wu (1997) Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of *TCE* and PCBs. *Environmental Science and Technology*. 31 (7) 2154- 2156
- Wang X, Chen C, Chang Y, Liu H (2009) Dechlorination of chlorinated methanes by Pd/Fe bimetallic *NPs*. *Journal of Hazardous Materials* 161:815-823
- Willey J, Sherwood L., Woolverton C. (2010). *Prescott's Microbiology*. 8th edn., McGraw-Hill Book Co., New York, USA.
- Xiu Z, Jin Z, Li T, Mahendra S, Lowry G, Alvarez P (2010) Effects of nano-scale zero valent iron particles on a mixed culture dechlorinating trichloroethylene. *Bioresource Technology* 101:1141-1146
- Yang, Y., McCarty, P. L. (1998). "Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture." *Environ Sci Technol* **32**:3591-3597.
- Yang, Y., Pesaro, M., Sigler, W., Zeyer, J. (2005). "Identification of microorganisms involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community." *Water Res* **39**:3954–3966.
- Yu, ZT; Smith, G. (2009) Inhibition of methanogenesis by C1- and C2-polychlorinated aliphatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Chem* 19(9): 2212-2217
- Zárate Segura P.B., Rios-Leal E., Esparza-García F., García-Mena J., Sanz J.L., Zaiat M., Poggi-Varaldo H.M. (2004). Perchloroethylene removal in two anaerobic continuous systems. *Interciencia* 29 562-567.
- Zhang L., Fozman B., Gilsdorf J., Marrs C. (2005). Bacterial genomic DNA isolation using sonication for microarray analysis. *BioTechniques* 39 640-644.

ANEXO A

Caracterización de la población microbiana utilizando TGGE

Procedimientos y Métodos

Se recolectaron 2 g del lecho de los RLF en tubos eppendorf y se almacenaron en el congelador a 4 °C hasta la extracción del ADN.

Para la extracción del ADN la muestra se puso a temperatura ambiente y se le agrego buffer 50 mM Tris 10 mM EDTA, pH 7.5. Después las muestras se colocaron en hielo y se sonicaron durante 8 min en intervalos de 1 min. Para evitar el calentamiento de las muestras (Zhang *et al.*, 2005). Posteriormente la muestra se procesó mediante el kit de extracción de DNA UltraClean Soil (MoBio Laboratories Inc.) (Mondragón-Parada *et al.*, 2008).

El DNA extraído se amplificó en la región 16S rRNA por PCR utilizando el iniciador con pinza GC U968 (5´ pinza GC-GAACGCGAAGAACCTTAC-3´) y el reverso L1401 (5´- GCGTGTGTACAAGACCC-3´) (Felske *et al.*, 1996).

El programa que se utilizó en el termociclador para la PCR con iniciadores para bacterias se muestra en la Tabla A1.

Tabla A1. Programa de amplificación de fragmentos de ADN de bacterias

Etapas	Temperatura	Tiempo (min.)
Inicio	94	5
Desnaturalización	94	1
Alineamiento	55	1
Extensión	72	2:30
final	72	10

Nota: las fases de inicio a extensión se repiten 35 veces

Los productos de la PCR de aproximadamente 450 pb se observaron en geles de agarosa al 1% (v/v), teñidos con bromuro de etidio. Los geles se dejaron correr a 80 V por una hora.

Análisis de los productos de PCR por TGGE.

Una vez confirmada la existencia de los productos del PCR se utilizó un gel de Poliacrilamida 8% con un gradiente desnaturante de temperatura (TGGE). El TGGE se realizó en el equipo TGGE System, 230/115 V (Whatman-Biometra) a 1.1 w, 125 V, 9 mA y con un gradiente de temperatura de 39-52° C. En la Tabla A2 se presenta la composición del gel de poliacrilamida.

Tabla A21. Composición de geles de Poliacrilamida

Sustancia	Concentración
H ₂ O	Desionizada
Regulador TAE ^b	1X
Urea	8M
Glicerol	2%
Policrilamida ^a	8%
Persulfato de amonio	10%

Notas: ^a Acrilamida: Bisacrilamida, 30:1, ^bTAE: 0.04 M Tris-acetato a pH 7-6 y 0.001 M EDTA a pH 8.0

Los geles se tiñeron en 70 mL del regulador TAE (1X) con 70 µg de Syber Green por 15 minutos. Posteriormente se observaron las bandas con ayuda de un transiluminador ECX-20.MX las bandas de interés se recortaron con un bisturí estéril. Se extrajo el material genético de las bandas recortadas según las instrucciones del kit de extracción QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) después se limpió y por último se realizó una nueva PCR con las condiciones antes descritas para ser mandado a secuenciar.

ANEXO B

Caracterización de la población microbiana con CARD-FISH

Procedimiento y métodos:

Se recolectaron 45mL de muestra del reactor de los cuales 5 ml fueron biopartículas y 40 mL agua sintética. Para fijar la muestra se adicionó 5 mL de formaldehído al 37%, se colocó a 4°C durante 2 horas. Después se adicionó 50 mL de etanol 96% e inmediatamente se colocaron a -20°C. Las muestras pueden permanecer congeladas por varios meses. La fijación permite conservar el RNA viable para los análisis. Antes de comenzar el análisis se agitó la muestra, se filtró con un filtro de 2 µl y el filtro se conservó en una caja de Petri a -20°C.

Preparación de la Sección

El filtro se cortó en secciones, y cada porción se usó para un análisis. Las secciones seleccionadas fueron colocadas en un portaobjetos nuevo y limpio. A cada una se le agregó 20 µl de agarosa al 0.2 % previamente calentado, la agarosa debe de mojar toda la sección. Después este portaobjetos fue colocado en el horno a 37°C por 10 min. Las secciones se retiraron hasta que estuvieron secas, algunas veces necesitan uno o dos min. mas en el horno. Una vez que las secciones estuvieron secas fueron enjuagadas con etanol al 96% en el portaobjetos hasta que se desprendieran del portaobjetos, posteriormente dejar secar en servilleta.

Permeabilización Celular

Emerger las secciones en la solución de lisozima e incubar en el horno a 37°C por 60 min. Al finalizar lavar la sección en agua MilliQ por 1 min

Transferir las secciones en la proteinasa K a 37°C por 3^o min. Al finalizar se lavó el filtro dos veces con agua MilliQ por 1 min.

Inactivación de la peroxidasa endógena: sumergir el filtro en HCl 0.01 M por 10 min. Al terminar, lavar con agua MilliQ 1 min. Después en etanol 96% 1 min. poner a secar en servilleta las secciones

Hibridación: emerger las secciones en el mix de hibridación e incubarlo a 46°C por al menos 3 horas a 46°C o dejarlo toda la noche a 35 °C.

Lavado: lavar las secciones en el buffer de lavado (calentado previamente), dejar incubando a 37°C por 20 min. al terminar poner las secciones en servilleta.

Amplificación de la Señal

Lavar las secciones en 10 mL de PBS 1x 0.05% por 15 min. Agitando de tanto en tanto. Al final secar en servilleta.

Incubar en el sustrato mix con la tiramida a 37°C por 15 min. en rotación

Lavar en 10 mL de PBS 1x 0.05% en la oscuridad por 30 min. agitando de tanto en tanto . Por último se lavara en 10 mL de agua MilliQ por 1 min, seguido de 1 min en etanol al 96%. Secar las secciones y montarlas en el portaobjetos, adicionar el DAPI 50 µl por sección y cubrir con un cubreobjetos.

Conservar a -20°C y en la oscuridad para que no se pierda la señal.

Buffer de lavado

NaCl 5M (variable in base a la stringenza)*

TrisHCl	1 mL
EDTA 0.25M	1 mL
SDS 25%	25µl
MQ	50 mL

% hibridacion NaCl 5M µl

0	9000
5	6300
10	4500
15	3180
20	2150

25	1490	*
30	1020	
35	700	
40	460	
45	300	
50	180	

Substratum mix

Solución A

PBS 1X 200 μ l + 30% H₂O₂ (agua especial) 1 μ l

Solución B

1200 μ l buffer amplificación + 12 μ l sol. A

Solución C

1000 μ l solución B + 1 μ l de tiramida

Amplification Buffer

20x PBS 2.5 mL

5M NaCl 20 mL

Blocking Reagent 0.5 mL

Make up to 50 mL with MQ

Almacenar a 4°C por varios meses

Agarosa al 0.2%

Agarosa 200 mg o 0.2 gr

MQ 100 mL

Lisozima

➤ Para 15 secciones, 2 mL

Lisozima 20 mg

EDTA 0.25 M 400 μ l

Tris HCl 1M	200 μ l
MQ	1400 μ l

➤ Para más de 15 secciones 10 mL

Lisozima	100 mg
EDTA 0.25 M	2 mL
Tris HCl 1M	1 mL
MQ	7 mL

Proteinasa K (stock solution 1 mg/mL keep a -20°C)

Proteinase K	11 μ l (o 16 μ l)
TE (0.09 U/mL)	4 mL (o 6 mL)

HCl 0.01 M

HCl 1 M	0.5 mL
MQ	49.5 mL

Mix di hibridación

➤ Para 15 secciones, 2 mL

Buffer de hibridación	200 μ l
Sonda (50 ng/ μ l)	2 μ l

➤ Para más de 15 secciones, 10 mL

Buffer de hibridación	400 μ l
Sonda (50 ng/ μ l)	4 μ l

ANEXO C

Cuantificación de la expresión de los genes DHC presentes en *Dehalococcoides*

Procedimientos y Métodos

El DNA extraído fue resuspendido en 100 µl de buffer TE (pH 8) además se le adiciono 1 mM de EDTA para quelar los cationes que puedan inhibir el procesamiento de las muestras.

La reacción de qPCR se realizó por triplicado Sd-1, Sd-2 y Sd-3 usando el método de cuantificación absoluta con la TaqMan (Applied Biosystems) con la 6-carboxyfluoresceine (FAM) como el fluoroforo reportero 5' y la N,N,N',N'-tetramethyl -6- carboxyrodamina (TAMRA) como el 3' quencher. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl con MaximaProbe/Rox qPCR MasterMix (2x), a una concentración de 300 nM para el primer y las pruebas, también se le agregó 2.5 µl de DNA.

El ciclo que fue usado fue: 2 min a 50°C, 10 min. a 94°C y 40 ciclos por 15 s a 95°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C.

Los resultados fueron analizados usando el equipo Applied Biosystems 7300 System Sequence Detection Thermocycler (Software versión 1.3, SDS v.1).