



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**“Biorrestauración de suelos agrícolas contaminados  
con agroquímicos utilizando reactores de suelos  
activados convencionales y electrobioquímico de  
nuevo tipo”**

**Que presenta**

***M. en C. Beni Camacho Pérez***

**Para obtener el grado de**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo**

**Dr. Jaime García Mena**

**El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en los siguientes laboratorios; laboratorio de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería bajo la dirección del Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo, en el laboratorio de Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas del Departamento de Biología Molecular y Genética Microbiana bajo la dirección del Dr. Jaime García Mena, en el laboratorio de Central Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería bajo la asesoría de la Profesora Elvira Ríos Leal y en el laboratorio de H<sub>2</sub> y Celdas de Combustibles del Departamento de Química bajo la asesoría del Dr. Omar Solorza-Feria.**

**Beni Camacho Pérez agradece al CONACYT por la beca con número de registro 209831 otorgada para el desarrollo de esta investigación**

# COMITÉ TUTORIAL



**Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo (Director)**  
CINVESTAV-IPN  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
Biotecnología Ambiental y Energías Renovables



**Dr. Jaime García Mena (Director)**  
CINVESTAV-IPN  
Departamento de Biología Molecular y Genética  
Microbiana  
Referencia y Apoyo para Caracterización de  
Genomas, Transcriptomas y Microbiomas



**Dra. Josefina Barrera Cortés (Asesora)**  
CINVESTAV-IPN  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
Control Inteligente de Bioprocesos



**Dr. Fernando Esparza García (Asesor)**  
CINVESTAV-IPN  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
Fisiología Microbiana



**Dra. Teresa Ponce Noyola (Asesora)**  
CINVESTAV-IPN  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
Genética microbiana



**QFB. Elvira Ríos-Leal (Asesora Extraordinaria)**  
CINVESTAV-IPN  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
Central Analítica



**Dra. Ileri Victoria Robles González (Asesora)**  
NovaUniversitas  
Departamento de Ingeniería en Agronomía



**M.C Noemi Rinderknecht Seijas  
(Asesora Extraordinaria)**  
IPN - ESIQIE



**Dr. Omar Solorza Feria (Asesor)**  
CINVESTAV-IPN  
Departamento de Química  
H<sub>2</sub> y Celdas de Combustibles

## *Dedicatoria*

*A mi madre, Blanca Esthela Pérez  
Por su amor y sacrificio  
Por su coraje y entereza  
Por su dulzura  
Te amo*

### *A mis Ángeles*

*Mi padre, Manuel Camacho Torres  
Mi abuelo, Manuel Camacho Gastélum  
Por su apoyo incondicional  
Por sus sabios consejos  
Por creer en mí  
Los extraño*

### *A mis hermanos*

*Saúl, Karina, Verónica y Rubén  
Por los momentos de alegría y tristeza  
que nos ha tocado vivir  
Por sus ocurrencias  
Por su amor*

### *A mis sobrinos*

*Manuel, Alexander y Mario  
Por sus sonrisas  
Por sus alegrías*

### *Ami abuelita*

*Concepción Pérez Galindo  
Por su valentía ante la vida*

### *A Adriana Ramírez-Castillo*

*Por iniciar conmigo esta etapa  
Por ser como una hermana*

### *A mi amor, Carlos Guevara-Reyes*

*Por todo lo que hemos vivido juntos  
Por su paciencia y comprensión  
Por no dejarme caer  
Te amo*

## *Agradecimientos*

*Es difícil expresar por escrito el agradecimiento a todas esas personas que han colaborado de alguna manera para la realización de esta tesis.*

### *A Dios*

*Gracias por darme la oportunidad de recorrer este camino, en algunas ocasiones sinuoso, en otras recto; sin embargo en cada uno de ellos he tenido un aprendizaje increíble*

### *Al Dr. Héctor Mario Poggi-Varaldo*

*Por su sabiduría y formación académica en esta etapa*

### *Al Dr. Jaime García-Mena*

*Por transmitir sus conocimientos*

### *Al Dr. Omar Solorza-Fería*

*Por su alegría que contagia para seguir en el camino de la investigación*

### *A la maestra Elvira Ríos-Leal*

*Por su cariño y amistad incondicional que me brindo en todo momento*

### *A mis asesores*

*Dra. Josefina Barrera-Cortés, Dr. Fernando Esparza-García,  
Dra. Teresa Ponce-Noyola, Dra. Irerí Robles-González, M. en C.  
Noemí Rínderknecht-Seijas*

*Por todo su apoyo, comentarios y tiempo dedicado*

## *Al Grupo de Biotecnología Ambiental y Energías Renovables*

*Al M. en C. Rafael Hernández Vera por su apoyo técnico y principalmente por sus consejos ante la vida.*

*Al Lic. David Portilla Silva por su apoyo técnico, uso correcto de sustancias peligrosas y por transmitir sus conocimientos de la música regional.*

*A la Ingeniera Teresa Sánchez Chávez por su apoyo técnico.*

*A mis compañeros de laboratorio Karla Muñoz Páez, Ana Lina Vázquez Larios, Gonzalo Escobedo Acuña, Carlos Escamilla-Alvarado, Luz Bretón-Deval, Giovanni Hernández-Flores y Leticia Romero Cedillo que me enseñaron que con dedicación y trabajo en equipo se logra el éxito.*

*A Diana y Jesus que me contagiaron de su entusiasmo.*

*A los chicos de servicio social Alan, Antonio y Javier que hacían de las tardes de laboratorio más llevaderas.*

*A Janeth Delgado Rojas por su apoyo experimental en este proyecto y amistad*

## *Al Personal de Central Analítica*

*A Cirino Rojas Chávez por sus asesorías en técnicas cromatográficas y por su valiosa amistad.*

*A Vinicio Mena por su apoyo técnico en cromatografía.*

*A Gustavo Medina por los análisis cromatográficos.*

## *Grupo de H<sub>2</sub> y Celdas de Combustible*

*Al Ing. Andrés Rodríguez Castellanos por su asesoría y dedicación en las técnicas de electroquímica y en el armado del reactor electrobioquímico.*

*Al Ing. Sebastián Citalán por su asesoría en las técnicas electroquímicas.*

*A Julio por su apoyo técnico y amistad*

*A la secretaria Gloria León Maturano por su apoyo administrativo*

## *Al Grupo Referencia y Apoyo para Caracterización de Genomas, Transcriptomas y Microbiomas*

*Al biólogo Alberto Piña Escobedo por haber proporcionado asesoría en las diversas técnicas para la caracterización de la comunidad microbiana y sus comentarios acerca de la vida.*

*A la bióloga Carolina Miranda Brito por sus comentarios y sobre todo por sus abrazos que siempre me confortaron.*

*A Rodrigo García Gutiérrez por su apoyo técnico y sus críticas constructivas*

*Selvasankar Murugesan por el trabajo de bioinformática y por sus comentarios positivos*

*A los chicos Fernando Violante, Marcela Ulloa y Verónica Cano, por el ambiente de trabajo, convivios y por supuesto el postre de los Lunes de seminario.*

## *Al personal administrativo*

*A Vanía Yamile Muñoz Macías por todos los trámites de coordinación académica y sobre todo por sus comentarios tan acertados*

*A Blanca Reyna Arizona Anaya por su apoyo administrativo*

## *Al Sr. Armando Barbosa Fernández*

*Por su importante contribución en la elaboración del reactor de suelos activados electrobioquímico y por sus charlas que siempre tenían un aprendizaje*

## *Al M. en C. Jesus Barrera Rojas*

*Por su excelente apoyo en la cuestión de computo del reactor de suelos activados electrobioquímico*

## *A mis compañeras y amigas de departamento*

*Adriana Ramírez Castillo por iniciar juntas, por los momentos que vivimos y por ser siempre mi confidente.*



*Ana Line Vázquez-Larios por siempre brindarme su amistad, sus consejos y sus puntos de vista que me hicieron cambiar de opinión.*

*Arelí Ortega-Martínez por ser mi favorita compradora de sueños, por compartir sus tristezas y alegrías.*

*Maricela Montaña-Valdéz por animarme a vivir la experiencia de ser una espartana.*

***A mi teacher Rocío Cruz***

*Por siempre estar al pendiente de mí*

***A mi gurú Karlita***

*Por sus enseñanzas en el camino espiritual*

***A mi familia Arce Pérez***

*Por siempre darme su apoyo incondicionalmente y por supuesto sus palabras alentadoras, los quiero mucho.*

***A mi familia Camacho Torres***

*Por confiar en mí*

***A la familia Guevara Reyes***

*Por estar presente en esta etapa, ánimos, entrenamientos, competencias y viajes.*

***A Jesus Madrigal y Belem Guevara***

*Por todo el apoyo que me han brindado incondicionalmente*

***A Jesus Alarcón Bonilla***

*Por su amistad brindada en cada momento*

***A mis compañeros de natación***

*Estela, Carlos, Luz, Evelín, Alejandro y Esteban por esos días de entrenamiento que hacían disminuir el estrés*

### *A la familia Robles González*

*Porque han sido parte de mi aprendizaje en este camino, gracias por compartir su historia, creencias, sabiduría y sobre todo su apoyo.*

### *A mis amigas de Sinaloa*

*Ana Lilia, Dalía, Lorena y Yadira. A pesar de la distancia siempre he contado con ustedes. Gracias por sus palabras. Las quiero.*



## ÍNDICE

Índice de Tablas.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Notación.....	viii
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
1 Introducción y Antecedentes.....	1
1.1 Plaguicidas.....	1
1.2 Contaminación ambiental por plaguicidas.....	2
1.2.1 Plaguicidas en México.....	4
1.3 Lindano.....	4
1.3.1 Modo de acción.....	6
1.3.2 Usos en México.....	6
1.4 Degradación anaerobia de lindano.....	7
1.5 Reactores de suelos activados.....	7
1.5.1 Ventajas y desventajas en la utilización de reactores de suelos activados.....	8
1.5.2 Descripción del proceso.....	8
1.6 Reactor electrobioquímico de nuevo tipo.....	9
1.6.1 Principio de una Celda de Combustible Microbiana.....	9
1.6.2 Biología molecular y su relación con el tratamiento de suelos contaminados.....	13
2 Justificación.....	15
3 Hipótesis.....	16
3.1 Hipótesis general.....	16
3.2 Hipótesis específicas.....	16
4 Objetivos.....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos específicos.....	17
5 Metodología.....	18
5.1 Estrategia de trabajo.....	18
5.2 Actividad 1. Operación de reactores inoculadores en ambiente anaerobio.....	19
5.2.1 Propósito.....	19
5.3 Actividad 2. Evaluar el desempeño de reactores de suelos activados en ambientes secuenciales: metanogénico/sulfato-reductor.....	22
5.3.1 Propósito.....	22
5.3.2 Diseño Experimental.....	22
5.4 Actividad 3. Diseño, construcción y caracterización de un reactor de suelo activado electrobioquímico.....	27
5.4.1 Propósito.....	27
5.5 Actividad 4. Operación en lote del reactor de suelo activado electrobioquímico.....	28
5.5.1 1 <sup>er</sup> Experimento (Suelo, 66%).....	28
5.5.2 2 <sup>do</sup> Experimento (Suelo, 33%).....	28
5.5.3 3 <sup>er</sup> Experimento (Suelo, 33%, Tween 80).....	29
5.6 Actividad 5. Caracterización de comunidades microbianas en el RSA EBQ 32	
5.6.1 Propósito.....	32



5.6.2	Extracción total de DNA .....	32
5.6.3	Evaluación de la integridad del DNA bacteriano por fraccionamiento electroforético .....	33
5.6.4	Cuantificación y pureza del DNA.....	33
5.6.5	Amplificación de la región 16S rDNA bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
5.6.6	Fraccionamiento electroforético en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de amplicones obtenidos por PCR.....	36
5.6.7	Recuperación del DNA (Fragmento del gen 16S rDNA) fraccionado en gel de poliacrilamida por el método de electroelución.....	36
5.6.1	Clonación de un fragmento del gen 16S rDNA en vector PCR™ 2.1-TOPO recuperado de un gel de DGGE por electroelución .....	38
5.6.1	Ligación .....	39
5.6.2	Transformación.....	39
5.6.3	Extracción de plásmido por el método de lisis alcalina.....	39
5.6.4	Confirmación por PCR de inserto en el plásmido PCR™ 2.1-TOPO 40	
5.6.5	Reacción de secuenciación del fragmento de 16S rDNA clonado en el vector pCR®4-TOPO® .....	41
5.6.6	Análisis de los electroferogramas y asignación de filogenia.....	43
5.7	Secuenciamiento masivo usando la Plataforma Ion Torrent (PGM) ...	43
6	Resultados y Discusión.....	45
6.1	Actividad 1. Reactores inoculadores en ambiente metanogénico y sulfato-reductor.....	45
6.2	Actividad 2. Evaluar el desempeño de reactores de suelos activados en ambientes secuenciales: metanogénico/sulfato-reductor .....	47
6.2.1	Remoción de lindano.....	47
6.2.2	Metabolitos intermediarios.....	49
6.3	Actividad 4. Evaluación de la remoción de lindano y producción de bioelectricidad en un RSA-EBQ.....	54
6.3.1	1 <sup>er</sup> Experimento (Suelo, 66%).....	54
6.3.2	2 <sup>do</sup> Experimento (Suelo, 33%) .....	61
6.3.3	3 <sup>er</sup> Experimento (Suelo, 33%, Tween 80).....	72
6.4	Actividad 5. Caracterización microbiana del reactor de suelos activados electrobioquímico por DGGE.....	78
6.4.1	Extracción total de DNA .....	78
6.4.2	Amplificación de la región 16s rDNA .....	79
6.4.3	Fraccionamiento electroforético en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de amplicones obtenidos por PCR.....	79
6.4.4	Análisis de los índices de similitud por presencia /ausencia de bandas 82	
6.4.5	Recuperación del DNA fraccionado en gel de poliacrilamida por el método de electroelución .....	86
6.4.6	Extracción de plásmido por lisis alcalina .....	88
6.4.7	Confirmación por PCR del inserto en el vector PCR™ 2.1-TOPO.....	89
6.4.8	Análisis de los electroferogramas y asignación de filogenia.....	90
6.4.9	Caracterización del consorcio microbiano usando el equipo Ion Torrent (PGM).....	93
7	Conclusiones .....	95
8	Bibliografía.....	97



9	Anexos .....	106
9.1	Anexo A. Presuntivo para determinar si la biomasa está adsorbiendo el lindano .....	106
9.1.1	Propósito .....	106
9.1.2	Equipo .....	106
9.1.3	Reactivos y Stock .....	106
9.1.4	Procedimiento.....	106
9.1.5	Cálculos.....	109
9.1.6	Resultados y Discusión .....	110
9.2	Anexo B. Demanda bioquímica de oxígeno de la materia orgánica soluble del extracto de suelo (DBO <sub>moses</sub> ) .....	111
9.2.1	Inoculo para ensayo DBO para extracto de suelo .....	111
9.2.2	Preparación de agua de dilución .....	112
9.2.3	Rangos de dilución para DBO .....	113
9.2.4	Preparación de la muestra de suelo para determinación de DBO 114	
9.2.5	Medición de DBO .....	114
9.2.6	Resultados .....	116
9.3	Anexo C. Medición de oxígeno disuelto por medio del método de Winkler modificado .....	117
9.3.1	Principio.....	117
9.3.2	Preparación de reactivos.....	117
9.3.3	Procedimiento para la determinación de oxígeno disuelto .....	121
9.4	Anexo D. Concentración de lindano y análisis de metabolitos por GC/MS 125	
9.5	Anexo E. Productividad.....	126
9.5.1	Artículos en revistas indexadas .....	126
9.5.2	Reconocimiento.....	126
9.5.3	Abstracts publicados en revistas indexadas.....	127
9.5.4	Capítulos en libros.....	127
9.5.5	Publicaciones en extenso en congresos internacionales .....	128



## Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del lindano.....	6
Tabla 2. Composición del agua de alimentación sintética para el reactor inoculador metanogénico.....	20
Tabla 3. Composición del agua de alimentación sintética para el reactor inoculador sulfato-reductor.....	20
Tabla 4. Seguimiento y análisis para el reactor inoculador metanogénico.....	21
Tabla 5. Seguimiento y análisis para el reactor inoculador sulfato-reductor.....	21
Tabla 6. Composición del medio mineral metanogénico.....	23
Tabla 7. Tabla de factores y niveles de ensayos con reactores de suelos activados en ambiente secuencial (metanogénico/sulfato-reductor). .....	24
Tabla 8. Seguimiento y análisis para los reactores de suelos activados en condiciones metanogénicas-aerobia utilizados para la remoción de lindano de suelo contaminado.....	26
Tabla 9. Composición de la mezcla de reacción para amplificar 16S rDNA bacteriano.....	35
Tabla 10. Protocolo de temperaturas para amplificación por PCR de fragmento del gen 16S rDNA con pinza de GC.....	35
Tabla 11. Componentes de la mezcla de reacción de ligación.....	39
Tabla 12. Composición de la mezcla de reacción para amplificar por PCR el fragmento de 16s rDNA bacteriano clonado en el vector PCR™ 2.1-TOPO.....	41
Tabla 13. Protocolo de temperatura para la amplificación por PCR del fragmento de 16s rDNA clonado en el vector PCR™ 2.1-TOPO.....	41
Tabla 14. Composición de la mezcla de reacción para secuenciar.....	42
Tabla 15. Protocolo de temperatura para la reacción de la secuenciación de inserto en el vector pCR®4-TOPO®.....	42
Tabla 16. Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos determinados en los reactores inoculadores.....	45
Tabla 17. Parámetros determinados en los reactores de suelos activados después de 15 días de operación.....	49
Tabla 18. Uso de reactores de suelos activados para la biorremediación de suelos contaminados con lindano.....	50
Tabla 19. Uso de celdas de combustibles microbianas de suelo para la generación de electricidad y/o biorremediación de contaminantes.....	56
Tabla 20. Desempeño promedio del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 1 (suelo, 66%).....	60
Tabla 21. Caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico a 0 y 7 días de operación, Experimento 2 (suelo, 33%).....	63
Tabla 22. Desempeño promedio del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 2 (suelo, 33%).....	66
Tabla 23. Identificación a nivel de género de todas las secuencias de la operación en lote del reactor de suelos activado electrobioquímico.....	71
Tabla 24. Valores de diversas variables de la caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico.....	74
Tabla 25. Parámetros evaluados en la operación del reactor de suelos activados electrobioquímico.....	76



Tabla 26. Concentración y pureza del DNA extraído de las muestras provenientes del RSA EBQ .....	79
Tabla 27. Número de bandas de bacterias vs tiempo en la operación del reactor de suelos activados electrobioquímico .....	84
Tabla 28. Índice de similitud de Jaccard, en las muestras del reactor de suelos activados electrobioquímico .....	84
Tabla 29. Índice de divergencia de Poggi, en las muestras del RSA EBQ .....	84
Tabla 30. Cuantificación del DNA plasmídico .....	89
Tabla 31. Tabla de identidad utilizando la herramienta BLAST .....	91
Tabla 32. Identificación a nivel de género de todas las secuencias de la operación en lote del reactor de suelos activados electrobioquímico.....	94



## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de lindano .....	5
Figura 2. Ruta de degradación propuesta de HCH bajo condiciones anaerobias .....	7
Figura 3. Estrategia de trabajo .....	18
Figura 4. Diagrama de flujo de la estrategia de reactores de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico-sulfato reductor para la remoción de lindano de suelo contaminado .....	26
Figura 5. Diagrama de flujo del ensayo extractivo con Tween 80 .....	30
Figura 6. Metodología general para la caracterización de consorcios microbianos por 16s rDNA DGGE .....	32
Figura 7. Unión de los primers CGO 465F y CGO 465R a la secuencia del <i>E. Coli</i> (gen 16S rDNA GenBank: J01859.1) .....	34
Figura 8. Esquema de una cámara de electroelución .....	37
Figura 9. Mapa del vector PCR™ 2.1-TOPO .....	38
Figura 10. Degradación de lindano en reactores de suelos activados metanogénico/sulfato-reductor .....	47
Figura 11. Metabolitos intermediarios en el reactor de suelos activado metanogénico-sulfato reductor .....	49
Figura 12. Diagrama de Nyquist y circuito equivalente del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 1 (suelo, 66%) .....	55
Figura 13. Generación de electricidad por el reactor de suelos activados electrobioquímico durante la operación en lote durante 30 días en el Experimento 1 (suelo, 66%) .....	59
Figura 14. Detención por GC/MS de lindano y metabolitos intermediarios en el reactor de suelos activados .....	61
Figura 15. Caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 2 (suelo, 33%) .....	62
Figura 16. Generación de electricidad en el reactor de suelos activados electrobioquímico durante la operación en lote durante 30 días en el Experimento 2 (suelo, 33%) .....	65
Figura 17. Detención por GC/MS de metabolitos intermediarios en el reactor de suelos activados electrobioquímico al final del tiempo de operación (30 días) en el Experimento 2 (suelo, 33%) .....	67
Figura 18. Identificación a nivel filo de la comunidad microbiana en el reactor de suelos activados electrobioquímico .....	70
Figura 19. Ensayo extractivo con Tween 80 .....	72
Figura 20. Dinámica de operación del reactor de suelos activados en lote durante 30 días de operación .....	76
Figura 21. Extracción de DNA .....	78
Figura 22. Reacción de PCR .....	80
Figura 23. Gel de DGGE, 25-70% .....	81
Figura 24. Monitoreo microbiano de la operación del reactor de suelos activados electrobioquímico en gel DGGE 25-70% .....	82
Figura 25. Gel de DGGE preparativo, muestra RSA EBQ a 22 días de operación .....	85
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa .....	86





Figura 27. Representación esquemática de la selección de bacterias azul- blanca en vectores recombinantes .....	87
Figura 28. Plaqueo de post-transformantes resultantes de la clonación del fragmento de 16S recuperado de DGGE .....	88
Figura 29. Plásmidos obtenidos de las clonas obtenidas de la banda 1, fragmento de 16s rDNA recuperado del gel de DGGE .....	88
Figura 30. Amplificación por PCR para la confirmación de la inserción del fragmento de 16S rDNA en el vector PCR™ 2.1-TOPO.. .....	89
Figura 31. Árbol filogenético para la secuencia de la banda 1 .....	92
Figura 32. Identificación a nivel filo de la comunidad microbiana en el reactor inoculador sulfato reductor y en el reactor de suelos activados electrobioquímico .....	93
Figura 33. Diagrama de flujo del proceso .....	108



## Notación

<b>1,2,4-TCB</b>	1,2,4-triclorobenceno
<b>1,4-DCB</b>	1,4-Diclorobenceno
<b>2,5-DCBQ</b>	2,5-diclorobenzoquinona
<b>2,5-DCHQ</b>	2,5- diclorohidroquinona
<b>2,5-DCP</b>	Diclorofenol
<b>2,6-DCHQ</b>	2,6-diclorohidroquinona
<b>CHQ</b>	Clorohidroquinona
<b>HCH</b>	Hexaclorociclohexano
<b><math>\gamma</math>-PCCH:</b>	$\gamma$ -2,3,4,5,6-pentaclorociclohexano
<b>RI</b>	Reactor inoculador
<b>RIM</b>	Reactor inoculador metanogénico
<b>RI-SR</b>	Reactor inoculador sulfato-reductor
<b>RSA</b>	Reactor de suelos activados
<b>RSA-M-SR</b>	Reactor de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico-sulfato-reductor
<b>SSV</b>	Sólidos suspendidos volátiles



## Caracteres griegos

$\eta_{\text{Lindano}}$	Remoción de lindano
$\eta_{\text{DQO}}$	Remoción de demanda química de oxígeno
$\eta_{\text{SO}_4}$	Remoción de sulfato
$\alpha$	Coeficiente entre alcalinidad parcial y alcalinidad total



## Resumen

El lindano ( $\gamma$ -hexaclorociclohexano,  $\gamma$ -HCH,) es un insecticida organoclorado que ha sido utilizado como insecticida alrededor del mundo, particularmente en México en el sector salud y agrícola. La utilización de lindano ha causado impactos negativos en el ambiente y en la salud humana. Debido a su toxicidad y persistencia está asociado con diversas enfermedades crónicas y diferentes tipos de cáncer. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) y el Convenio de Estocolmo lo han clasificado como contaminante orgánico persistente y han prohibido su uso. Debido a que existen diferentes sitios contaminados con insecticidas es necesario el uso de tecnologías de biorremediación. Los biorreactores de suelos activados (slurry bioreactors) configuran una de las tecnologías de biorremediación *ad situ* y *ex situ* más importante. El tratamiento de suelos y sedimentos en biorreactores de suelos activados se ha convertido en una de las mejores opciones para la biorremediación de suelos pesados, contaminados con compuestos recalcitrantes, en virtud que las condiciones ambientales pueden ser controladas. Por otro lado un reactor electrobioquímico de suelos activados es un dispositivo que constituye una tecnología prometedora que es capaz de remover contaminantes orgánicos y recalcitrantes con simultánea generación de electricidad.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar el desempeño de dos tipos de biorreactores para la biorremediación de suelos contaminados con agroquímicos:

(i) Reactor de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico-sulfato reductor y (ii) Reactor de suelos activados electrobioquímico. Los objetivos específicos fueron: (1) Evaluar el efecto de la adición de solvente sobre la remoción de lindano utilizando un reactor de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico-sulfato reductor; (2) Construir, caracterizar y operar un reactor de suelos activados electrobioquímico; (3) Caracterizar la diversidad de las comunidades microbianas en el reactor de suelos activados electrobioquímico; (4) Evaluar el efecto de la adición de tensoactivo sobre la remoción de lindano y generación de bioelectricidad utilizando un reactor de suelos activados electrobioquímico.



El reactor de suelos activados sin silicona mostró 66% de remoción de lindano. Inesperadamente, el reactor de suelos activados con silicona mostró 54% de remoción de lindano. Los metabolitos intermediarios detectados cualitativamente a 30 días de operación fueron clorobenceno y 1, 2 diclorobenceno.

El desempeño del reactor de suelos activados electrobioquímico (concentración de suelo, 66%) durante 30 días de operación, mostró una eficiencia de remoción de lindano de 30%, la potencia volumétrica máxima fue 165 mW/m<sup>3</sup>, la eficiencia de remoción de materia orgánica fue alta (72%, como demanda química de oxígeno, materia orgánica natural), la eficiencia coulombimétrica fue baja (5.4%).

Durante la operación en lote del reactor de suelos activados (concentración de suelo, 33%) mostró un 78% de remoción de lindano, potencia volumétrica máxima de 634 mW/m<sup>3</sup>, la remoción de materia orgánica fue de 76% y la eficiencia coulombimétrica de 15%. Los principales metabolitos debido a la degradación de lindano fueron 1, 2, 3-triclorobenceno, 1,3-diclorobenceno, 1,2-diclorobenceno y clorobenceno. El reactor de suelos activados exhibió una alta remoción de lindano y bonus de generación de electricidad. El análisis metagenómico permitió la identificación de 18 fila (*phyla*) los más representativos fueron: Actinobacteria (6.35%), Bacteroidetes (17%), Firmicutes (46.4%), Proteobacteria (17.9%), and Synergistetes (7.16%)

Con respecto a la operación en lote del reactor de suelos activados electrobioquímico con Tween 80 (2000 mg/L) la eficiencia de remoción de lindano fue de 56%, potencia volumétrica 685 mW/m<sup>3</sup> y voltaje promedio de 420 mV. La fila (*phyla*) más representativos fueron Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria. Los géneros más dominantes fueron *Arcobacter* (40.8 %) y *Trichococcus* (41.6%) a 22 días de operación, cuando el reactor de suelos activados electrobioquímico exhibió el voltaje máximo.



## Abstract

Lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane,  $\gamma$ -HCH) is an organochlorinated pesticide that has been extensively used worldwide for the control of agricultural and medical pests. Nowadays, its use has been banned, since it is considered one of the priority organic pollutants under the Stockholm Convention on persistent organic pollutants. Bioslurry reactors are the most common *ex-situ* reactor configuration for soil bioremediation because of several advantages. On the other hand, electrobiochemical slurry reactor (EBCR) constitutes a promising technology that could remove organic and recalcitrant pollutants in contaminated soils with simultaneous electricity output.

The general aim of this research was to evaluate performance of two types of bioreactors for the bioremediation of soils contaminated with pesticides: (i) methanogenic-sulfate reducing slurry reactor, and (ii) electrobiochemical slurry reactor. The specific aims were: (1) to evaluate the effect of solvent on lindane removal using lab scale methanogenic-sulfate reducing slurry reactor; (2) to build, to characterize and to operate an electrobiochemical slurry; (3) to characterize the microorganisms in the electrobiochemical slurry reactor; (4) to determine the power output and removal of lindane from soil in presence of Tween 80 in the electrobiochemical slurry reactor.

The methanogenic-sulfate reducing slurry reactor without silicone oil showed a 66% lindane removal efficiency. Unexpectedly, units added with silicone oil exhibited a lower removal, 54%. After 30 d operation chlorobenzene and 1-2 dichlorobenzene were detected.

The electrobiochemical slurry reactor (The concentration of soil, 66%) showed 30% lindane removal efficiency at the end of 30 d batch operation, the volumetric power was  $165 \text{ mW m}^{-3}$ , the organic matter removal was very high (72% as soluble chemical oxygen demand, natural organic matter) whereas the coulombic efficiency was low (5.4%).

The electrobiochemical slurry reactor (concentration of soil, 33%) showed 78% lindane removal efficiency, the volumetric power was  $634 \text{ mW/m}^3$ , the organic matter removal was 76% and, the coulombic efficiency was low (15%). Main metabolites due to lindane degradation in the electrobiochemical slurry reactor were detected by analysis by GC/MS: 1, 2, 3-trichlorobenzene, 1, 3-



dichlorobenzene, 1, 2-dichlorobenzene, and chlorobenzene. Metagenomic analysis allowed the identification of 18 phyla for the electrobiochemical slurry reactor, of which the dominant phyla were Actinobacteria (6.35%), Bacteroidetes (17%), Firmicutes (46.4%), Proteobacteria (17.9%), and Synergistetes (7.16%).

During the batch operation of electrobiochemical slurry reactor with Tween 80, the electrobiochemical slurry reactor showed a 56% lindane removal, average volumetric power of 685 mW/m<sup>3</sup>, and average voltage of 420 mV were achieved. The most representative phyla were Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria, that was consistent with findings reported in the open literature. The most dominant genera were *Arcobacter* (40.8%), *Thrichococcus* (41.6%) at 22 days of operation, when the EBCR exhibited the maximum voltage.



# 1 Introducción y Antecedentes

## 1.1 Plaguicidas

La utilización de los plaguicidas ha beneficiado a la sociedad moderna mediante la mejora de la cantidad y calidad en la producción mundial de alimentos, Sin embargo el hombre al utilizar plaguicidas sintéticos para diversos fines (agricultura, ganadería, salud pública, etc.) ha contaminado casi todos los sustratos del ambiente biótico y abiótico; esto ha ocurrido a causa de la fácil dispersión de estos compuestos y por la gran persistencia de muchos de ellos en el ambiente (Goncalves and Alpendurada, 2005).

El uso de plaguicidas para el control de insectos, malezas y agentes de enfermedades, permite la producción de alimentos para la población mundial de más de 6 millones de personas (Mertens *et al.*, 2007; Waliszewski *et al.*, 1999).

Debido a su amplio uso, se han detectado en diversas matrices ambientales, tales como suelo, agua y aire (Alegria *et al.*, 2008). Debido a su naturaleza lipofílica, hidrofobicidad y baja degradación química y biológica, los plaguicidas organoclorados se han acumulado en los tejidos biológicos, aumentando la concentraciones en los organismos, debido a la cadena alimenticia (Hernández-Romero *et al.*, 2004).

La mayor cantidad de envenenamientos en el mundo ocurre por plaguicidas; la Organización Mundial de la Salud, OMS, estima que en el mundo ocurren más de 3 millones de envenenamientos anuales y que probablemente la mortalidad es mayor del 1% en algunos países. Según estadísticas mundiales, uno de cada 7 trabajadores se intoxica por el uso de plaguicidas. Estos datos son más alarmantes si se tiene en cuenta que en América Latina, donde más se ha incrementado su uso en los últimos años y con ello las intoxicaciones, una gran cantidad de mujeres en edad reproductiva trabaja en actividades agrícolas, expuestas a plaguicidas en condiciones de alta peligrosidad. Es importante destacar que las intoxicaciones no son el único riesgo de los plaguicidas. A ellas se suman otros peligros sobre la salud humana y animal, como enfermedades crónicas, mutaciones genéticas, cáncer, malformaciones congénitas (teratogénesis), alteraciones endocrinas u hormonales, problemas reproductivos





y sobre el sistema inmunológico, por exposición ocupacional o a residuos en agua, aire y alimentos contaminados.

La problemática de los plaguicidas y su uso está íntimamente relacionada con aspectos sociales, políticos, económicos y de soberanía alimentaria. La industria agroquímica ha promovido su uso con el argumento de que son necesarios para asegurar una adecuada producción de alimentos en la creciente población mundial; sin embargo, los criterios utilizados en el cálculo de pérdidas de cosechas por plagas y enfermedades han sido cuestionados; la misma FAO ha reconocido que estas pérdidas se incrementan notablemente aunque se usen cada vez más plaguicidas.

## **1.2 Contaminación ambiental por plaguicidas**

Los plaguicidas se aplican por vía aérea o con equipos terrestres, generalmente en forma líquida pero también como polvos y granulados. Muchos de los venenos aplicados tienen la capacidad de contaminar el aire por derivas o pérdidas durante la aplicación, por evaporación y por erosión eólica. La deriva o transporte por el viento es mayor cuando se aplican por vía aérea, calculándose que por esta vía solamente entre un 5% a 15% del plaguicida aplicado llega a su objetivo, dispersándose la mayor parte sobre otros ecosistemas, contaminándolos y afectando la salud de los pobladores asentados en las cercanías.

Las aguas superficiales y subterráneas se contaminan durante los procesos de fabricación, transporte, almacenamiento o aplicación de plaguicidas. En las zonas agrícolas ocurre directa o indirectamente, cuando se aplican al agua para matar larvas de mosquitos u otros organismos acuáticos, por derivas, por escorrentía, por drenajes de áreas agrícolas tratadas y durante el lavado de equipos de aspersión o por derrames accidentales. Los plaguicidas pueden afectar la vida acuática vegetal y animal por acción tóxica directa, o indirectamente por contaminación de especies que sirven de alimento a otras, o por producir cambios físico-químicos en el ambiente acuático. El transporte de plaguicidas a través de la corriente de los ríos desde zonas agrícolas hasta las zonas costeras, estuarios y desembocaduras, afecta los ambientes marinos de alimentación, cría y desarrollo de un gran número de especies acuáticas de importancia económica y ambiental.



El suelo se contamina mediante aplicación directa o por aspersión a cultivos, durante los cuales una parte cae al suelo, donde puede ser absorbido por las plantas, sufrir degradación química, fotoquímica o biológica, evaporarse y/o persistir en el suelo absorbido a arcillas o a materia orgánica. Otra fuente de alta contaminación del suelo agrícola la constituyen los desechos tóxicos de plaguicidas, como empaques, envases y restos de plaguicidas sin utilizar.

Una forma particular de contaminación grave de suelos la constituyen los entierros ilegales y clandestinos de productos obsoletos o caducados, los cuales se han venido descubriendo en los últimos años en muchos países de América Latina, porque se han hecho evidentes cuando se han iniciado procesos de construcción, por intoxicaciones de comunidades cercanas, por emisión de vapores tóxicos o por contaminación de aguas subterráneas de consumo. Los plaguicidas químicos que llegan al suelo pueden causar múltiples efectos a las poblaciones de organismos del suelo, a la viabilidad de las semillas y a los procesos fisiológicos de los cultivos. Su aplicación siempre afectará la vida del suelo, bien sea de manera cuantitativa, incidiendo sobre el tamaño y número de especies o, cualitativamente, en cuanto al funcionamiento de las poblaciones. La contaminación del suelo por plaguicidas adquiere también particular importancia debido a la transferencia de estos contaminantes a los alimentos a través de las raíces de las plantas que consumimos hombres y animales. En el caso de la producción pecuaria, los residuos pueden pasar del suelo al forraje para finalmente ser absorbidos por los animales, causando intoxicaciones agudas y crónicas y/o concentrándose en la grasa y aumentando la tasa de residuos en carne y leche (Nivia, 2000).

La contaminación y deterioro de los suelos debe detenerse urgentemente, porque la vida del hombre sobre la tierra ha dependido y continuará dependiendo del equilibrio dinámico del complejo viviente que son los suelos, cuya fertilidad depende de infinidad de organismos micro y macroscópicos que los habitan. Desde las bacterias hasta el hombre, todos los seres se encuentran interrelacionados e inevitablemente cualquier factor que afecte el funcionamiento de unos organismos tendrá impacto en otros.

Debido a lo mencionado anteriormente, la aplicación de los plaguicidas ha sido prohibida por su toxicidad, persistencia ambiental y acumulación en la



cadena alimentaria, sin embargo en países en vías de desarrollo dichos compuestos se siguen utilizando por razones económicas y nuevos sitios son contaminados (Quintero *et al.*, 2005; Pesce and Wunderlin, 2004).

### 1.2.1 Plaguicidas en México

En los últimos años se ha considerado a México de ser una región con un alto potencial del uso de plaguicidas organoclorados del resto del Norte de América. La cantidad exacta de plaguicidas organoclorados usados en México es difícil de determinarla, sin embargo han sido sustanciales (Alegria *et al.*, 2008). González-Farías (2003) estimó que entre los años 1969 y 1979, se usó aproximadamente 9000 ton/año de plaguicidas, de los cuales 7800 toneladas fueron producidas localmente. Por otro lado, datos publicados por el INEGI (2000), la superficie de suelo degradado por causas de contaminación en 1999 fue de 25,967 km<sup>2</sup>. Sin embargo, pueden mencionarse de manera cualitativa los problemas de contaminación generados por el uso de agroquímicos, tanto fertilizantes (en especial los nitrogenados) como de plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas); los que son consecuencia del derrame y fugas de combustibles (petróleo y derivados), así como los ligados a actividades mineras, en sus etapas de extracción como en las de procesamiento de los materiales obtenidos (INEGI-SEMARNAT, 1997). Muchos de los plaguicidas empleados en el país hasta la fecha, se han prohibido en otros países por su toxicidad. Sin embargo, el número de plaguicidas se incrementa a razón de 10% al año. Esto ha permitido que el número de productos que entran en contacto con la población, se incremente en más de seis veces (CICOPLAFEST, 2000). En México aún continúan en el mercado agroquímicos organoclorados como el ácido 2,4 dicloro-fenoxiacético (2,4-D), el pentaclorofenol (PCP) y dicofol, además de plaguicidas a base de carbamatos y los organofosforados como el malatión.

### 1.3 Lindano

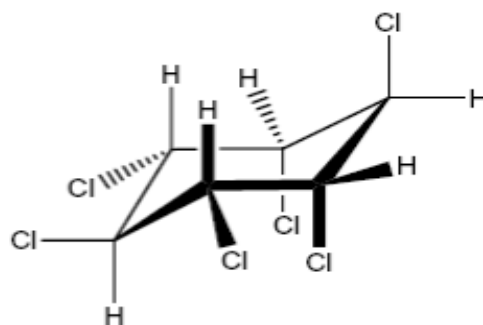
Los compuestos halogenados constituyen uno de los mayores grupos de contaminantes ambientales como resultado de su amplio uso como herbicida, insecticida, fungicida y solvente. La producción y uso de sustancias químicas como refrigerantes, pinturas, herbicidas y plaguicidas han causado daños ambientales y problemas en la salud humana, esto es debido a la persistencia,

toxicidad y transformación de dichos compuestos xenobióticos en metabolitos que pueden ser iguales o más tóxicos que el propio contaminante. Debido a su toxicidad, bioconcentración y persistencia, la distribución de los compuestos halogenados en la biosfera ha causado preocupación pública por los posibles efectos sobre la calidad de vida (Fetzner *et al.*, 1994; Kipopoulou *et al.*, 2004).

El lindano ( $\gamma$ -hexaclorociclohexano,  $\gamma$ -HCH,) es un insecticida organoclorado que ha sido utilizado para combatir una amplia gama de insectos que viven en el suelo y se alimentan de las plantas. Su aplicación es común en una gran variedad de cultivos, en bodegas, en la cría de ganado, como tratamiento para semillas (a menudo junto con fungicidas) y en la salud pública para el control de enfermedades transmitidas por insectos (Sang *et al.*, 1999; Quintero *et al.*, 2005; Singh and Kuhad, 1999).

Durante la producción del lindano una mezcla de diferentes isómeros son formados, los más importantes de estos son los siguientes: alpha, beta, gamma y delta HCH. El hexaclorociclohexano (HCH) técnico está compuesto aproximadamente por las siguientes cantidades: 12%  $\gamma$ -HCH, 65%  $\alpha$ -HCH, 12%  $\beta$ -HCH y 7%  $\Delta$ -HCH. Sin embargo el que presenta propiedades insecticidas es el  $\gamma$ -HCH (Bachmann *et al.*, 1988, Figura 1, Tabla 1).

La utilización de lindano ha causado impactos negativos en el ambiente y en la salud humana. Debido a su toxicidad y persistencia está asociado con diversas enfermedades crónicas y diferentes tipos de cáncer. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) y el Convenio de Estocolmo lo han clasificado como contaminante orgánico persistente y han prohibido su uso (Nagata *et al.*, 1993; Quintero *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estructura de lindano



### 1.3.1 Modo de acción

El lindano actúa como un estimulante en el sistema nervioso causando convulsiones epilépticas y la muerte. En el sistema nervioso el lindano interfiere con el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) en la función neurotransmisora al interactuar con el complejo canal del receptor cloruro-GABA<sub>A</sub> en el sitio de unión picrotoxina. Otros efectos son daños en el riñón y en el hígado (Sang *et al.*, 1999).

### 1.3.2 Usos en México

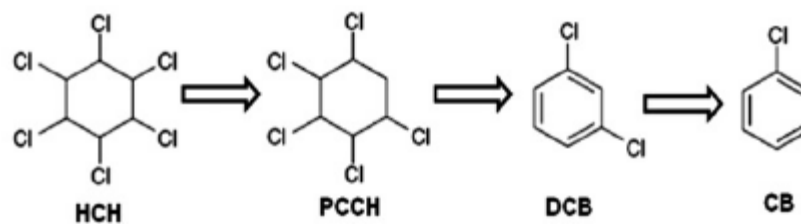
- En el sector pecuario el lindano se aplica en ganado vacuno y porcino para combatir garrapatas, pulgas, larvas de la mosca común, etc.
- En el sector agrícola se utiliza para el tratamiento de semillas: avena, cebada, frijol, maíz, sorgo y trigo. Se aplica como plaguicida en cultivos de trigo y sorgo.
- En la salud pública en materia de salud humana corresponde al control de pediculosis y la sarna. La sarna se ubica entre las diez principales causas de enfermedad (morbilidad) en las comunidades indígenas en México. La población infantil está 30 veces más expuesta al lindano que los adultos. Con base en el consumo de productos lácteos y agua, se calcula que el consumo diario promedio de lindano es de 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  para los adultos y de 0.66  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  para los niños.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas del lindano (Environmental Health Criteria, 1991)

<b>Nombre común</b>	<b>Lindano</b>
Peso molecular	290.83
Color	Blanco
Estado físico	Solidó cristalino
Punto de fusión (°C)	112.8
Punto de ebullición (°C)	288
Solubilidad en agua	7.3- 7.8 mg/L a 20 °C
Constante de Henry (H <sub>c</sub> )	$2.92 \times 10^{-6} \text{ atm}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$
Presión de vapor	$7.33 \times 10^{-8} \text{ atm}$
Log K <sub>ow</sub>	3.72

#### 1.4 Degradación anaerobia de lindano

Quintero *et al.* (2006) reportaron 100% de degradación de  $\alpha$  y  $\gamma$ -HCH en un suelo contaminado después de tres días en incubación anaerobia, bajo las siguientes condiciones: concentración inicial de lindano de 100mg/kg de suelo, se inoculó con 8 g SSV/L de lodos anaerobios metanogénicos y utilizaron almidón como sustrato. Durante el proceso de degradación, diversos metabolitos intermediarios fueron detectados como pentaclorociclohexano (PCCH), tetraclorociclohexano (TCCH), 1, 2,3-triclorobenceno (1, 2,3-TCB), 1,3-diclorobenceno (1,3-DCB) como producto final clorobenceno (Figura 2). Boyle *et al.* (1999) reportaron que bacterias anaerobias de sedimentos marinos y bacterias sulfato-reductoras son capaces de utilizar el lindano como fuente de carbono obteniendo como productos finales clorobenceno y benceno.



**Figura 2.** Ruta de degradación propuesta de HCH bajo condiciones anaerobias (adaptado de Quintero *et al.*, 2005) HCH: Hexaclorociclohexano; PCCH: Pentaclorociclohexano; DCB: Diclorobenceno; CB: Clorobenceno.

#### 1.5 Reactores de suelos activados

Los biorreactores de suelos activados (slurry bioreactors) es una de las tecnologías de biorremediación *ad situ* y *ex situ* más importantes. El tratamiento de suelos y sedimentos en biorreactores de suelos activados se ha convertido en una de las mejores opciones para la biorremediación de suelos contaminados por compuestos recalcitrantes, en virtud que las condiciones ambientales pueden ser controladas (Robles-González *et al.*, 2008a; Venkata Mohan *et al.*, 2004).

La utilización de los reactores de suelos activados es una aplicación relativamente nueva para la biorrestauración de sitios contaminados, esta tecnología ha sido aplicada para biorremediar suelos contaminados con plaguicidas organoclorados (Robles-González, 2012; Robles-González, 2008b;



Quintero *et al.*, 2005; Okeke *et al.*, 2002; Quintero *et al.*, 2006; Quintero *et al.*, 2007), Bifenilos policlorados (Fava and Piccolo, 2002), pentaclorofenol (Rubilar *et al.*, 2007) herbicidas (Robles-González *et al.*, 2006), explosivos (Park *et al.*, 2003; Boopathy, 2005; Fuller and Manning, 2004; Zhang *et al.*, 2001), insecticidas organofosforados (Venkata Mohan *et al.*, 2007), hidrocarburos del petróleo (Boopathy, 2003; Nano *et al.*, 2003; Tetsuji *et al.*, 2007), ftalatos o ésteres de ftalato (Shailaja *et al.*, 2008; Juneson *et al.*, 2001; Shailaja *et al.*, 2007)

### **1.5.1 Ventajas y desventajas en la utilización de reactores de suelos activados**

Los reactores de suelos activados presenta las siguientes ventajas: (a) Incremento en la transferencia de masa e incremento en el contacto del microorganismo con los nutrientes y contaminantes (Venkata Mohan *et al.*, 2009), (b) Mayor y más rápida biodegradación de los compuestos tóxicos comparado con la biorremediación in situ, (c) Posibilidad de utilizar diferentes aceptores de electrones ( $O_2$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $CO_2$ ,  $NO_3$ ), (d) Control y optimización de diversos parámetros ambientales como: temperatura, pH (e) Facilita la desorción de los contaminantes en el suelo debido a que se pueden utilizar tensoactivos y solventes (Robles-González *et al.*, 2008a; Boopathy 2003; Di Gennaro *et al.*, 2008; Okeke *et al.*, 2002). Las desventajas que presentan los RSA son las siguientes: (a) Excavación y transporte del suelo, lo cual aumenta los costos del tratamiento, (b) El suelo antes de tratarse debe ser acondicionado, (c) El agua utilizada durante el proceso requiere de un tratamiento antes de descargarse al medio ambiente, además (d) los gases producidos cuando el tratamiento es en ambiente anaerobio debe ser tratado antes de descargarlo a la atmósfera (Robles-González *et al.*, 2008a).

### **1.5.2 Descripción del proceso**

El suelo excavado debe ser tratado primero para separar físicamente piedras y escombros. El suelo se mezcla con agua, la cantidad de agua depende de la concentración de los contaminantes, la tasa de biodegradación y la naturaleza física de los suelos. Algunos procesos requieren de un pre-lavado del suelo para concentrar los contaminantes. El suelo se mantienen en suspensión en un



reactor y se mezcla con nutrientes, diferentes aceptores de electrones, inóculo y tensoactivo si el proceso lo requiere. Cuando se completa la biodegradación el agua es retirada del suelo, los equipos que son utilizados para retirar el agua pueden ser clarificadores, filtros de presión, filtros de vacío o centrifugas (Cookson, 1995).

Los reactores de suelos activados utilizan microorganismos nativos o cepas específicas que tienen la capacidad metabólica para convertir compuestos orgánicos peligrosos a dióxido de carbono y en agua. Estos sistemas pueden trabajar bajo condiciones aerobias y anaerobias (Venkata-Mohan *et al.*, 2004).

Los RSA permiten optimizar las condiciones propicias para la biodegradación del contaminante, la aireación facilita el mezclado y mejora la tasa de intercambio químico entre las partículas del suelo y de la solución. Las condiciones pueden ser aún más optimizadas para la biodegradación mediante el control de pH, temperatura, suministro de nutrientes y utilización de tensoactivos (Baker *et al.*, 1994).

La efectividad de la biorremediación utilizando reactores de suelos activados va a depender de varios parámetros como el tipo de suelo, tipo y concentración de contaminantes, diseño del reactor, carga de sólidos, aireación, demanda de oxígeno, temperatura, surfactante y la adición de nutrientes. Para el diseño de estos sistemas debemos de tomar en cuenta, las condiciones de funcionamiento, tipo de inóculo, la naturaleza del sustrato ya que tienen una influencia muy importante en el buen funcionamiento de los reactores de suelos activados. Cuando el volumen del suelo a tratar es relativamente pequeño y el contaminante es complejo es recomendable la utilización de reactores en lote (Venkata-Mohan *et al.*, 2004).

## **1.6 Reactor electrobioquímico de nuevo tipo**

### **1.6.1 Principio de una Celda de Combustible Microbiana**

Las celdas de combustibles microbianas (CCM) es una tecnología prometedora para la biodegradación de diversos sustratos orgánicos (glucosa, acetato, xilosa, cisteína, celulosa) con simultánea generación de energía. En este dispositivo los microorganismos son capaces de oxidar diferentes sustratos en el ánodo, produciendo protones y electrones, los cuales fluyen a través de un circuito

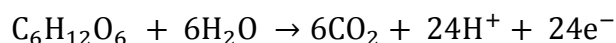




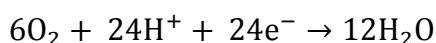
externo hacia el cátodo, que está en contacto con oxígeno, en esta parte los protones son usados en la reducción de oxígeno produciendo agua (Yan *et al.*, 2012; Ringelberg *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Huang, *et al.*, 2011 Vázquez-Larios *et al.*, 2010; Poggi-Varaldo *et al.*, 2009; Rezai *et al.*, 2009; Logan *et al.*, 2006).

En la siguiente ecuación se muestra el proceso que ocurre en una celda de combustible microbiana, cuando el sistema es alimentado con glucosa (Rismani *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 2006).

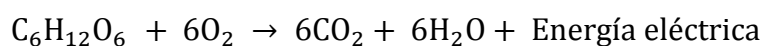
### Ánodo



### Cátodo



La ecuación global es la siguiente:



Aprovechamiento teórico: - 2840 kJ/mol

#### 1.6.1.1 Celda de Combustible Microbiana para el tratamiento de aguas contaminadas con xenobiótico

El uso de las celdas de combustible microbiano es una tecnología prometedora, debido que pueden ser tratadas aguas residuales y simultáneamente genera electricidad, se han llevado a cabo otras investigaciones en el tratamiento de aguas contaminadas con compuestos tóxicos, entre los que se pueden citar se encuentran: fenol, diésel, nitrobenzeno, ácido tereftálico, rojo congo, pentaclorofenol; por lo cual la aplicación de dichos sistemas es prometedor debido que además de dar un tratamiento a desechos industriales simultáneamente se genera energía eléctrica (Luo *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2008; Huo *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011).



Luo *et al.* (2009) trabajaron con una celda de doble cámara empacada con grafito granular, utilizaron glucosa como co-sustrato y fenol como compuesto tóxico, en 48 horas reportan 90% de remoción del contaminante y simultáneamente obtuvieron una potencia máxima de 342 mW/m<sup>2</sup> cátodo. Por otro lado Morris *et al.* (2009) reportaron que utilizaron una celda de doble cámara, el agua tratada estaba contaminada con diésel (300mg/L), después de 21 días se alcanzó 82% de remoción del contaminante y obteniendo una potencia de 32mW/m<sup>2</sup>. En una celda de doble cámara se trató un agua contaminada con nitrobenzeno (250mg/L) y como co-sustrato glucosa (1000mg/L) en donde se removió el 98% del contaminante en un periodo de 24 horas, se obtuvo una densidad de potencia de 8.5 W/m<sup>3</sup> cátodo (Li *et al.*, 2010).

Por lo anterior mencionado podemos considerar que el uso de celdas de combustibles microbianas es una tecnología prometedora para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con compuestos tóxicos.

#### **1.6.1.2 Principio de una Celda de Combustible Microbiana de sedimentos**

Se han realizado diferentes investigaciones para la producción de energía eléctrica, en sedimentos. Para este propósito, las investigaciones han desarrollado celdas de combustible microbianas de sedimentos, las cuales consisten de un ánodo sumergido en el sedimento anaerobio y un cátodo suspendido en el agua (condiciones aerobias). Las bacterias en el sedimento transfieren los electrones producidos en la oxidación de la materia orgánica e inorgánica hacia el ánodo. Mientras el oxígeno presente en la columna de agua es reducido por la aceptación de electrones en el cátodo (De Schampelaire *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009; Zhu and Ni, 2009).

#### **1.6.1.3 Reactor de suelos activados electrobioquímico**

Por lo anterior mencionado de los reactores de suelos activados para el tratamiento de suelos contaminados con compuestos recalcitrantes, el uso de celdas de combustibles microbianas en el tratamiento de aguas contaminadas y sedimentos para la generación de energía eléctrica, en el presente trabajo se



propone la hibridación de estas tecnologías, el reactor de suelos activados electrobioquímico. Dicha tecnología es relativamente nueva la cual involucra desarrollos multidisciplinarios.



### 1.6.2 Biología molecular y su relación con el tratamiento de suelos contaminados

La diversidad de los microorganismos en el ambiente juegan un rol importante en los procesos biogeoquímicos y la composición y/o actividad de estos microorganismos pueden indicar que tan bien está funcionando un ecosistema. Sin embargo, los microorganismos son sensibles a disturbios causados por la agricultura, contaminación y estrés ambiental. Consecuentemente se han llevado muchos estudios en el impacto del hombre (agricultura o contaminación) y animales (lombrices y termitas) sobre la microbiología del suelo (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001).

Se han llevado numerosas investigaciones las cuales han señalado que la mayoría de las bacterias en las muestras ambientales no pueden ser aisladas o cultivadas usando solamente técnicas tradicionales de cultivo. Solamente una pequeña proporción de la biomasa microbiana puede ser cultivada de esta forma (Cullen and Hirsch, 1997). El cultivo de las bacterias es determinado como un porcentaje de bacterias cultivables comparado con el total de células contadas detectadas con el microscopio de fluorescencia. Amman *et al.* (1995) reportaron que las bacterias cultivables de hábitat naturales son del rango de 0.001% en agua marina y 0.3 % en suelo. Muchos de los microorganismos que permanecen inaccesibles son especies en donde las condiciones de cultivo aplicadas no son adecuadas o que han entrado en un estado no cultivable. Además, los medios selectivos no están disponibles para muchos grupos de microorganismos, y si su número es bajo, estos pueden ser imposibles de detectar por técnicas de microbiología tradicionales. Muchos de los microorganismos del suelo son extremadamente adaptados a su ambiente y no pueden ser cultivados bajo las condiciones usuales de laboratorio.

El aislamiento del DNA de los microorganismos del suelo podría evitar sesgos en la detección de la diversidad microbiana del suelo (Roose-Amsaleg *et al.*, 2001). Los principales procesos que ocurren en el suelo, por ejemplo, el destino de los plaguicidas no se pueden explicar solo por factores abióticos. Debido al rol que juegan los microorganismos en la degradación de estos compuestos, un entendimiento de la función del suelo requiere la descripción de



la estructura, composición, densidad y diversidad de las comunidades microbianas del suelo.

Las posibles relaciones entre la biodiversidad de las comunidades microbianas del suelo y sus funciones siguen siendo poco investigados, principalmente debido a la falta de métodos adecuados. La aplicación de las herramientas de biología molecular en la microbiología del suelo tiene un gran potencial. El material genético es el diagnóstico final para la detección de microorganismos particulares. Una consideración importante es que solo una pequeña porción de las bacterias de los hábitat naturales pueden ser cultivadas en técnicas de microbiología clásica por lo cual es necesario la utilización de técnicas de biología molecular (Neufeld *et al.*, 2006).

#### **1.6.2.1 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)**

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante conocido por su abreviación en inglés como DGGE. Este método fue inventado originalmente para detectar mutaciones puntuales en el campo de la medicina (Fischer and Lerman, 1979). Sin embargo Muyzer *et al.* (1993) introdujeron está en el estudio de ecología microbiana.

El principio de la técnica de DGGE consiste en el fraccionamiento por electroforesis de fragmentos de DNA del 16s ribosomal amplificados por la técnica de PCR. El fraccionamiento se hace en geles de poliacrilamida con un gradiente creciente de agentes desnaturalizantes (urea y formamida). Este método se basa en el hecho de que fragmentos de DNA de misma longitud tienen diferente secuencia en su composición de pares de bases nucleotídicas (Muyzer and Smalla, 1998).



## 2 Justificación

Desde la introducción de los plaguicidas organoclorados en la agricultura y salud pública ha provisto de grandes beneficios para el ser humano en la producción y cosecha de sus alimentos y en el combate de vectores en programas de salud. Sin embargo su extensivo y mal uso ha traído como consecuencia la contaminación de suelo, agua y sedimentos alrededor del mundo. El lindano es un plaguicida organoclorado el cual ha sido prohibido debido a su persistencia en el ambiente, además puede causar problemas graves en la salud. La biorremediación es una opción que ofrece la posibilidad de degradar varios contaminantes a su forma menos tóxica utilizando microorganismos o su actividad enzimática. Utilizando reactores de suelos activados para la biorremediación incrementa la tasa de degradación de dicho xenobiótico debido a que las condiciones de operación pueden ser manipuladas.

Por otro lado existe la posibilidad de utilizar reactores electrobioquímicos de nuevo tipo capaces de oxidar la materia orgánica y biodegradar el lindano presente en el suelo y paralelamente los protones y electrones generados en dicha oxidación pueden generar bioelectricidad.



### **3 Hipótesis**

#### **3.1 Hipótesis general**

1. El reactor de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico/sulfato-reductor con solvente exhibirá mayores remociones de lindano que el RSA en ambiente secuencial metanogénico/sulfato-reductor sin solvente
2. El reactor de suelos activados electrobioquímico presentará buen desempeño para descontaminar el suelo y generar bioelectricidad

#### **3.2 Hipótesis específicas**

1. El reactor de suelo activados en ambiente secuencial metanogénico/sulfato- reductor bioestimulado con sacarosa mostrará mayores remociones de lindano que el RSA en ambiente secuencial metanogénico/sulfato-reductor sin sacarosa
2. El reactor de suelos activados electrobioquímico servirá para descontaminar el suelo y generar bioelectricidad
3. La presencia de tensoactivo (Tween 80) aumentara la remoción de lindano en el reactor de suelos activados electrobioquímico
4. La comunidad microbiana presente en el RSA EBQ se enriquecerá con bacterias electroquímicamente activas



## **4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el desempeño de dos tipos de biorreactores para la biorremediación de suelos contaminados con agroquímicos:

- Reactor de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico-sulfato reductor
- Reactor de suelos activados electrobioquímico

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de la adición de solvente sobre la remoción de lindano utilizando un RSA en ambiente secuencial metanogénico-sulfato reductor.
2. Construir, caracterizar y operar un reactor de suelos activados electrobioquímico para el tratamiento de suelo contaminado con lindano y simultáneamente generar bioelectricidad.
3. Caracterizar la diversidad de las comunidades microbianas en el reactor de suelos activados electrobioquímico
4. Evaluar el efecto de la adición de tensoactivo sobre la remoción de lindano y generación de bioelectricidad utilizando un reactor de suelos activados electrobioquímico





## 5 Metodología

### 5.1 Estrategia de trabajo

La realización del proyecto se dividió en 3 fases y 5 actividades (Figura 3), que de manera general se refieren a la aclimatación de inóculo capaz de degradar lindano, caracterización del suelo modelo utilizado y estudios de remoción del lindano en ambientes secuenciales mediante la utilización de reactores de suelos activados y el uso de reactor de suelos activados electrobioquímico para la remoción de lindano y simultáneamente la producción de energía eléctrica.

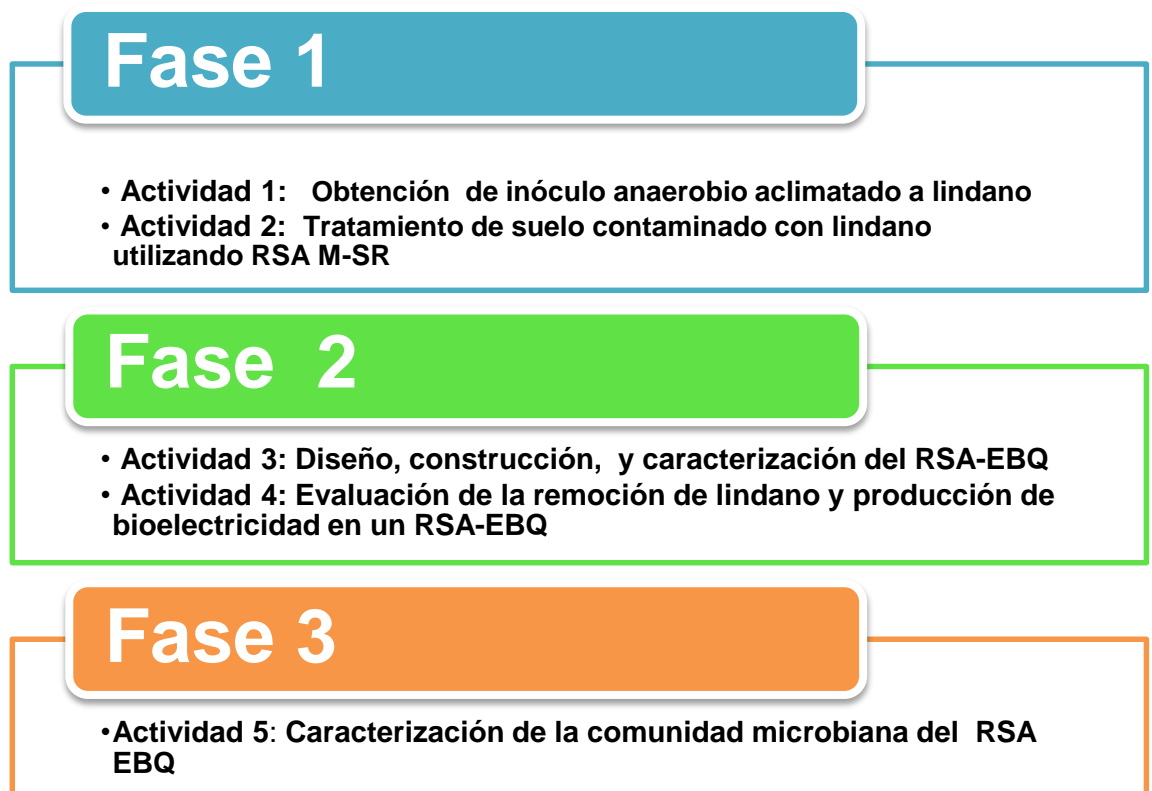


Figura 3. Estrategia de trabajo



## 5.2 Actividad 1. Operación de reactores inoculadores en ambiente anaerobio

### 5.2.1 Propósito

Esta actividad cumple con el propósito de generar inóculo aclimatado al lindano que posteriormente será utilizado para estudios de remoción de dicho xenobiótico en suelos arcillosos contaminados con lindano empleando reactores de suelos activados y reactor de suelos activados electrobioquímico.

Durante esta actividad se operaron reactores inoculadores a escala laboratorio bajo dos diferentes aceptores de electrones ( $\text{CO}_2$ , metanogénico y  $\text{SO}_4^{2-}$ , sulfato-reductor).

Para la preparación del inóculo anaerobio se siguió el siguiente procedimiento: se pesaron 900 gramos de excreta de vaca húmeda y se disolvieron en 3000 mL de agua. Posteriormente esta solución se pasó por un tamiz malla número 10 (0.0781 in), ésta misma solución se pasó a través de un tamiz número 33 (0.0190 in), de esta solución filtrada se utilizaron 1500 mL y se mezclaron con 1500 mL de lodos activados procedentes de una planta de tratamiento de aguas residuales (San Juan Ixhuaxtepec). Para garantizar condiciones anaerobias los reactores inoculadores se gasearon con nitrógeno durante 5 minutos. La operación del reactor fue semi-continua, con un volumen de operación ( $V_{OP}$ ) de 3000 mL, con un tiempo de residencia ( $TRH$ ) de 25 días por lo que el flujo de alimentación se determina con la ecuación 1. La purga y alimentación es de 120 mL/día. El agua de alimentación sintética se muestra en la Tabla 2 y 3 para el RI-M y RI-SR respectivamente

$$Q = \frac{V_{OP}}{TRH} \quad [1]$$

#### 5.2.1.1 Seguimiento y análisis

Las variables de respuesta para el RI-M son las siguientes: pH,  $\eta_{DQO}$ ,  $\eta_{Lindano}$ , SSV, Factor  $\alpha$ , Biogás,  $\text{CH}_4$ . Para el RI-SR son: pH,  $\eta_{DQO}$ ,  $\eta_{Lindano}$ , SSV, Factor  $\alpha$ , Biogás,  $\text{CH}_4$  y  $\eta_{\text{SO}_4^{2-}}$ .



El programa de seguimiento y análisis se muestra en las Tablas 4 y 5 para los reactores inoculadores metanogénico y sulfato-reductor respectivamente.

**Tabla 2.** Composición del agua de alimentación sintética para el reactor inoculador metanogénico

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Sacarosa	5
NaHCO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3.0
NH <sub>4</sub> Cl	0.6
CH <sub>3</sub> COOH <sub>glacial</sub>	1.5 mL/L
Lindano	7 mg/L

**Tabla 3.** Composición del agua de alimentación sintética para el reactor inoculador sulfato-reductor

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
Sacarosa	5
NaHCO <sub>3</sub>	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3.0
NH <sub>4</sub> Cl	0.6
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.75 mL/L
Lindano	7mg/L

**Tabla 4.** Seguimiento y análisis para el reactor inoculador metanogénico

Parámetro	Alimentación	Efluente	Gas	Método
pH	1/día	1/día	NA	Método estándar 423 <sup>b</sup>
DQO	1/sem	1/sem	NA	Método estándar 508 <sup>b</sup>
SSV <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	1/sem	NA	Método estándar 403 <sup>b</sup>
Coefficiente $\alpha$	NA	1/sem	NA	Ripley <i>et al.</i> , 1986
Volumen de biogás	NA	NA	1/día	Poggi-Varaldo <i>et al.</i> , 1987
CH <sub>4</sub>	NA	NA	1/sem	Poggi-Varaldo <i>et al.</i> , 1987
Concentración de lindano	1/sem	1/sem	NA	Quintero <i>et al.</i> , 2005

**Notas:** <sup>a</sup> No aplicable; <sup>b</sup> APHA, 1998

**Tabla 5.** Seguimiento y análisis para el reactor inoculador sulfato-reductor

Parámetro	Alimentación	Efluente	Gas	Método
pH	1/día	1/día	NA	Método estándar 423 <sup>b</sup>
DQO	1/sem	1/sem	NA	Método estándar 508 <sup>b</sup>
SSV <sup>a</sup>	NA <sup>a</sup>	1/sem	NA	Método estándar 403 <sup>b</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	1/sem	1/sem	NA	Método estándar 426C <sup>b</sup>
Concentración de lindano	1/sem	1/sem	NA	Quintero <i>et al.</i> , 2005

**Notas:** <sup>a</sup> No aplicable; <sup>b</sup> APHA, 1998



### 5.3 Actividad 2. Evaluar el desempeño de reactores de suelos activados en ambientes secuenciales: metanogénico/sulfato-reductor utilizando tratamiento extractivo con solvente (aceite de silicona)

#### 5.3.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue evaluar el efecto de la adición de solvente sobre la remoción de lindano de suelos arcillosos con alto contenido de materia orgánica utilizando reactores de suelos activados

#### 5.3.2 Diseño Experimental

Esta actividad a su vez se dividió en tres etapas: acondicionamiento del inóculo, preparación del medio mineral, arranque y operación de los reactores de suelo activados.

##### 5.3.2.1 Acondicionamiento del inóculo

- i. Se determinó la concentración de SSV en el reactor inoculador metanogénico: **Y**.
- ii. La concentración de biomasa requerida en cada RSA fue de 0.5mg/mL: **X**.
- iii. Se realizaron los cálculos con la ecuación 2 para obtener el volumen necesario de licor del RI-M.

$$\frac{X*Z}{Y} = W$$

[2]

#### En donde:

**W**: Volumen necesario de licor del RI-M

**X**: Concentración de biomasa requerida en cada RSA (mg SSV/mL)

**Y**: Concentración de SSV en el reactor inoculador RI-M (mg/mL)

**Z**: Volumen del RSA (mL)

- iv. Ya calculado el volumen necesario de licor del RI-M (**W**), se colectaron las células por centrifugación (7000 rpm durante 10 minutos)
- v. Desechar el sobrenadante.



vi. Las células fueron lavadas 3 veces con 5 mL de buffer de fosfato (pH = 7.2) y finalmente se re-suspendió en 3 mL del mismo buffer. El acondicionamiento del inóculo se llevó a cabo en una cabina anóxica con flujo continuo de nitrógeno.

### 5.3.2.1 Preparación del medio mineral

El medio mineral se preparó con los componentes que se citan en la Tabla 6, posteriormente se esterilizó a 121°C/lb durante 15 minutos.

**Tabla 6.** Composición del medio mineral metanogénico en 1 L de agua desionizada

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 mg
NaHCO <sub>3</sub>	4 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mg
Solución de resazurina	10 mL (1g/L)

(Bachmann *et al.*, 1988, modificado)

### 5.3.2.2 Arranque y operación de los reactores de suelo activados.

#### 5.3.2.2.1 Unidades experimentales activas

Los reactores de suelos activados consistieron en viales de 125 mL, en el cual se colocaron 20g de suelo estéril contaminado (100 mg lindano/kg suelo seco), 60 mL de medio mineral, 0.5mg SSV/mL de inóculo aclimatado al contaminante en condiciones metanogénicas (Esto se llevó a cabo en una cabina anóxica, que previamente fue gaseada con nitrógeno). Las unidades experimentales fueron cerradas con septas de teflón, selladas con anillos de aluminio y gaseadas con nitrógeno durante 1 minuto para garantizar la anaerobiosis. Los RSA se incubaron en la oscuridad, a 120 rpm, a 35°C durante 15 días. Al término de 15 días de incubación las unidades experimentales se abrieron para cambiar a condiciones sulfato-reductoras, se agregó 0.5mg SSV/mL del inóculo aclimatado al contaminante en condiciones sulfato-reductoras, posteriormente fueron cerradas con septas de teflón, se sellaron con anillos de aluminio y gaseadas con nitrógeno durante 1 minuto para garantizar la anaerobiosis (Figura 4).



El diseño experimental se evaluó la bioestimulación con sacarosa y aceite de silicona a dos niveles 0 y 15 mL (Tabla 7).

**Tabla 7.** Tabla de factores y niveles de ensayos con reactores de suelos activados en ambiente secuencial (metanogénico/sulfato-reductor).

<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>
Solvente	0 (0 % V/V)
	15 mL (0 % V/V)

Las variables de respuesta son:

- Remoción de lindano
- Metabolitos intermediarios
- Producción de metano

### 5.3.2.2.2 Controles

**Control abiótico:** Para evaluar la adsorción del lindano en el suelo.

En viales de 125 mL, se colocaron 20 g de suelo estéril contaminado (100 mg lindano/kg suelo seco), 60 mL de medio mineral, 0.5 mg SSV/mL de inóculo estéril aclimatado al lindano y 30 mg de ázida de sodio. Se incubaron en la oscuridad, a 120 rpm, a 35°C durante 15 días. Después de 15 días de incubación se abrieron las unidades experimentales para cambiar a condiciones sulfato-reductoras, se agregó 0.5mg SSV/mL del inóculo estéril aclimatado al contaminante en condiciones sulfato-reductoras, posteriormente los viales fueron cerrados con septas de teflón, sellados con anillos de aluminio y gaseados con nitrógeno durante 1 minuto para garantizar la anaerobiosis. Esto se llevó a cabo para que fueran las mismas condiciones que las unidades experimentales activas.



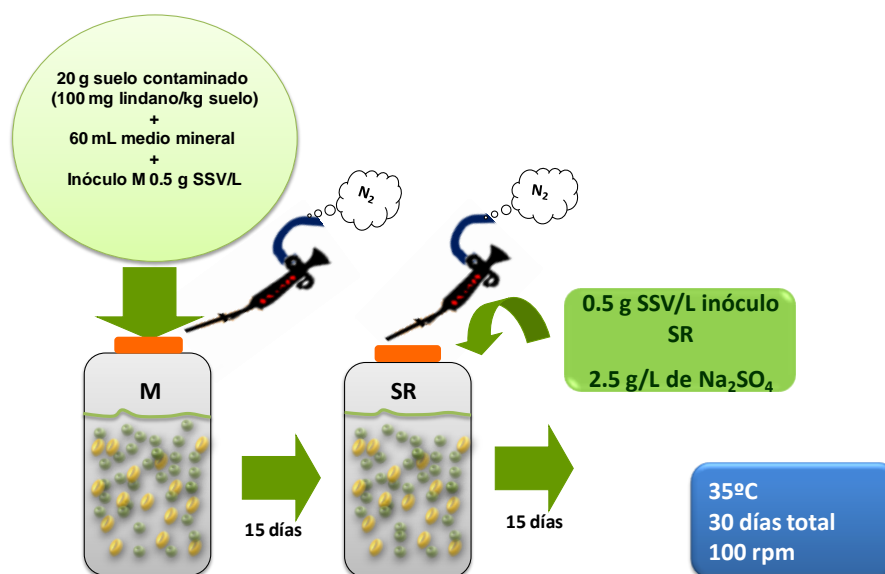
**Control biótico:** Para evaluar la capacidad de degradación del contaminante por el consorcio presente en el suelo.

En viales de 125 mL se colocaron 20 g de suelo contaminado sin esterilizar (100 mg lindano/kg suelo seco), 60 mL de medio mineral, 0.5 mg SSV/mL de inóculo estéril aclimatado al lindano. Después de 15 días de incubación se abrieron las unidades experimentales para cambiar a condiciones sulfato-reductoras, se agregó 0.5mg SSV/mL del inóculo estéril aclimatado al contaminante en condiciones sulfato-reductoras, posteriormente los viales fueron cerrados con septas de teflón, sellados con anillos de aluminio y gaseados con nitrógeno durante 1 minuto para garantizar la anaerobiosis. Esto se llevó a cabo para conservar las mismas condiciones que las unidades experimentales activas.

**Bioaugmentación:** Para evaluar la capacidad de degradación del contaminante por el consorcio presente en el suelo y el inóculo aclimatado al lindano.

En viales de 125 mL se colocaron 20 g de suelo contaminado sin esterilizar (100 mg lindano/kg suelo seco), 60 mL de medio mineral, 0.5 mg SSV/mL de inóculo aclimatado al lindano. Se incubaron en la oscuridad, a 120 rpm, a 35°C durante 15 días. Después de 15 días de incubación se abrieron las unidades experimentales para cambiar a condiciones sulfato-reductoras, se agregó 0.5mg SSV/mL del inóculo aclimatado al contaminante en condiciones sulfato-reductoras, posteriormente los viales fueron cerrados con septas de teflón, sellados con anillos de aluminio, y gaseados con nitrógeno durante 1 minuto para garantizar la anaerobiosis. Esto se llevó a cabo para conservar las mismas condiciones que las unidades experimentales activas.





**Figura 4.** Diagrama de flujo de la estrategia de reactores de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico-sulfato reductor para la remoción de lindano de suelo contaminado

### 5.3.2.1 Seguimiento y análisis

Se tomó muestra de cada uno de los RSA cada cinco días. El programa de seguimiento y análisis se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Seguimiento y análisis para los reactores de suelos activados en condiciones metanogénicas-aerobia utilizados para la remoción de lindano de suelo contaminado

Parámetro	Sobrenadante	Licor	Gas	Método
pH	NA <sup>a</sup>	1/5 d	NA	Standard methods 423 <sup>b</sup>
Concentración de lindano	NA	1/5 d	NA	Polese <i>et al.</i> , 1996
Producción de metano	NA	NA	1/5d	Poggi-Varaldo <i>et al.</i> , 1987
Metabolitos intermedarios	1/15 d	NA	NA	Quintero <i>et al.</i> , 2005

**Notas:**<sup>a</sup> No aplicable; <sup>b</sup> APHA, 1998



## **5.4 Actividad 3. Diseño, construcción y caracterización de un reactor de suelo activado electrobioquímico**

### **5.4.1 Propósito**

El propósito de esta actividad es diseñar y construir un reactor de suelo activado electrobioquímico para evaluar la remoción de lindano y la generación de bioelectricidad.

### **5.4.2 Caracterización del reactor de suelo activado electrobioquímico**

#### **5.4.2.1 Propósito**

El propósito de esta actividad es caracterizar el reactor de suelo activado electrobioquímico para obtener la resistencia interna del sistema utilizando un inóculo sulfato-reductor

##### **5.4.2.1.1 Determinación de resistencia interna del reactor electrobioquímico en el 1<sup>er</sup> Experimento por espectroscopía de impedancia**

La resistencia interna ( $R_{int}$ ) del EBQ fue calculada como una función del voltaje del EBQ usando espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, por sus siglas en inglés). La espectroscopía de impedancia electroquímica fueron obtenidas alrededor del rango de frecuencia de 1mHz a 100 kHz (Sathish-Kumar *et al.*, 2012b; Vázquez-Larios *et al.*, 2011a; Vázquez-Larios *et al.*, 2011b). El modelo del circuito equivalente fue ajustado a los datos usando el programa ZView2.

##### **5.4.2.1.2 Determinación de resistencia interna del reactor electrobioquímico en el 2<sup>do</sup> Experimento y 3er Experimento por curva de polarización**

La resistencia interna fue determinada usando el método de curva de polarización, por variación de la resistencia externa (100-10000 $\Omega$ ) de acuerdo al procedimiento descrito en literatura (Logan *et al.*, 2006; Poggi-Varaldo *et al.*, 2009; Vázquez-Larios *et al.*, 2010; Sathish-Kumar *et al.*, 2012a), esto fue llevado a cabo a los 0 y 7 días de operación.



## 5.5 Actividad 4. Operación en lote del reactor de suelo activado electrobioquímico

VARIABLES DE RESPUESTA

- Remoción de lindano
- Densidad de potencia,  $P_{An}$  en  $mW/m^2$
- Potencia volumétrica,  $P_v$  en  $mW/m^3$
- Eficiencia coulumbimétrica,  $\eta_{Coul}$  en %
- Remoción de DQO,  $\eta_{DQO}$  en %

### 5.5.1 1<sup>er</sup> Experimento (Suelo, 66%)

El EBQ fue operado en lote durante 30 días a temperatura ambiente. La concentración del suelo fue de 66% p/v. El reactor no fue suplementado con una fuente de carbono externa, el sustrato fue la materia orgánica soluble del suelo. Las medidas de potencia fueron obtenidas usando un multímetro ESCORT 3146A.

### 5.5.2 2<sup>do</sup> Experimento (Suelo, 33%)

El EBQ fue operado en lote durante 30 días a temperatura ambiente. La concentración del suelo fue de 33% p/v. El EBQ fue alimentado a 15 y 25 días de operación con una solución stock de sacarosa: acetato de sodio: lactato para obtener una concentración final de 2g DQO/L en el reactor. El contenido del EBQ fue mezclado por burbujeo con nitrógeno, una vez al día durante los primeros 15 días de operación. Posteriormente fue mezclado lentamente en una agitadora orbital a 100 rpm. Las medidas de potencia fueron registradas en un multímetro ESCORT 3146A. Los controles del proceso fueron: (i) EBQ operado a circuito abierto con inoculo y suelo no estéril, (ii) reactores de suelos activados convencionales, inoculo y suelo estéril, control biótico y control abiótico respectivamente.



### **5.5.3 3<sup>er</sup> Experimento (Suelo, 33%, Tween 80)**

#### **5.5.3.1 Ensayo extractivo con Tween 80**

##### **5.5.3.1.1 Propósito**

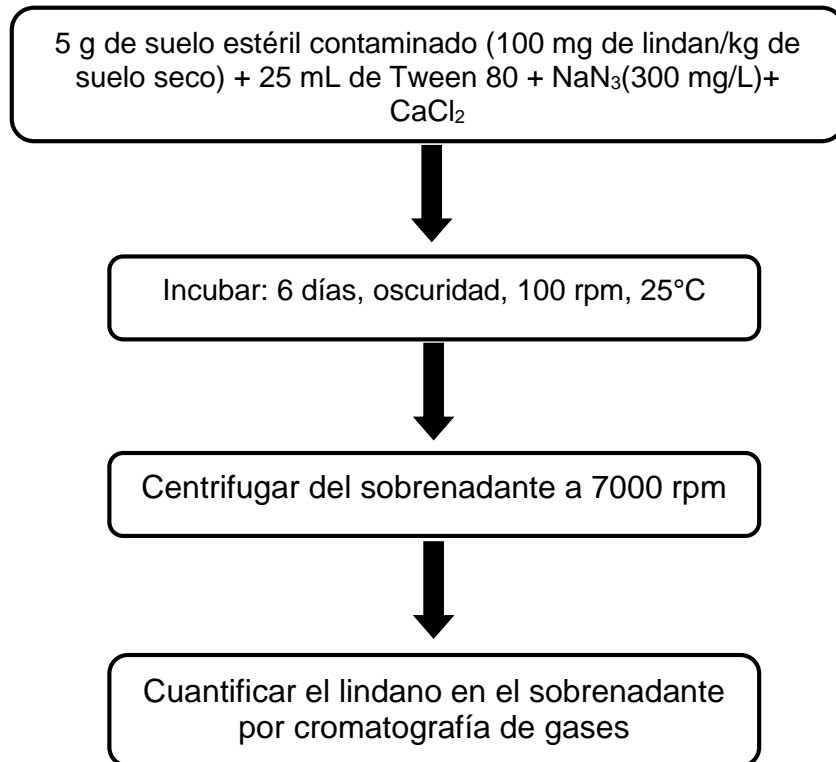
Evaluar la desorción del lindano del suelo con Tween 80 a diferentes concentraciones.

##### **5.5.3.1.1.1 Diseño experimental**

Se realizaron experimentos en lote para evaluar la desorción de lindano en un sistema suelo-agua en presencia de tensoactivo no-ionico, Tween 80, a diferentes concentraciones (0, 75, 500, 2000, 5000 mg/L)

##### **5.5.3.1.1.2 Procedimiento**

- i.* Se prepararon soluciones de Tween 80 a diferentes concentraciones (0, 75, 500, 2000 y 5000 mg/L) con 300 mg/L de azida de sodio y 0.01M CaCl<sub>2</sub>.
- ii.* En botellas serológicas se colocaron 5 g de suelo estéril contaminado (100 mg de lindano/kg de suelo seco).
- iii.* Se agregaron 25 mL de solución de Tween 80.
- iv.* Las unidades experimentales se incubaron a 25°C, 100 rpm, en la oscuridad, por 6 días.
- v.* Al finalizar el periodo de contacto, se decantó y centrifugó (7000 rpm por 15 minutos) el sobrenadante de cada unidad experimental.
- vi.* Se cuantificó la concentración de lindano en el sobrenadante por cromatografía de gases.



**Figura 5.** Diagrama de flujo del ensayo extractivo con Tween 80



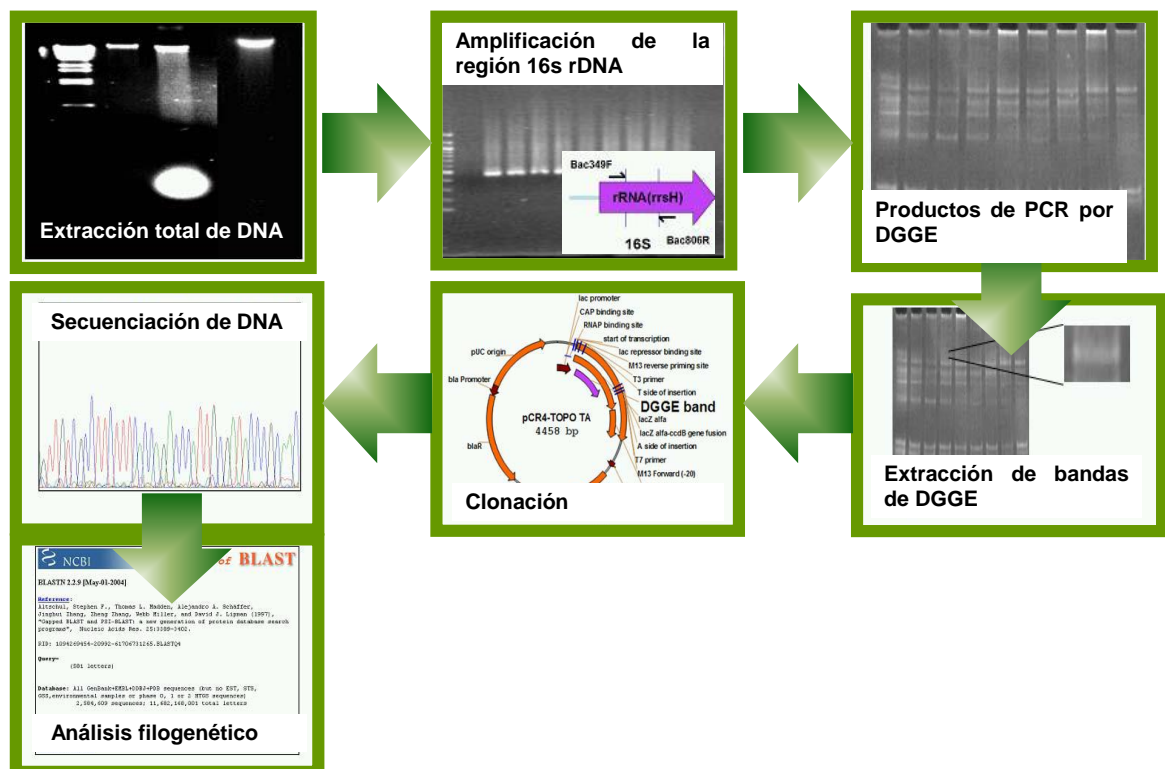
### **5.5.3.2 Operación en lote del reactor de suelos activados electrobioquímico**

El EBQ fue operado en lote durante 30 días a temperatura ambiente. La concentración del suelo fue de 33% p/v. El EBQ fue alimentado a 0 y 15 días de operación con una solución stock de sacarosa: acetato de sodio: lactato para obtener una concentración final de 2g DQO/L en el reactor. El EBQ fue cargado con la concentración de Tween 80 que mejores resultados de desorción presente. El EBQ fue mezclado lentamente en una agitadora orbital a 100 rpm. Las medidas de potencia fueron registradas en un multímetro ESCORT 3146A.

## 5.6 Actividad 5. Caracterización de comunidades microbianas en el RSA EBQ

### 5.6.1 Propósito

El propósito de esta actividad fue desarrollar las técnicas de biología molecular para caracterizar la comunidad microbiana presente en el RSA y en el RSA EBQ.



**Figura 6.** Metodología general para la caracterización de consorcios microbianos por 16s rDNA DGGE. (García-Mena, 2006)

### 5.6.2 Extracción total de DNA

Se procedió a la extracción de DNA bacteriano de una alícuota de 200 µl de una muestra proveniente del RSA EBQ siguiendo el protocolo adjunto al kit de extracción, PowerSoil® DNA Isolation kit (MoBio) que funciona para la extracción de DNA de muestras de suelo.



### 5.6.3 Evaluación de la integridad del DNA bacteriano por fraccionamiento electroforético

Para comprobar la calidad del DNA extraído se cargaron 2 µl de extracto total con buffer de carga 1X (solución de azul bromofenol y glicerol 5x) en gel de agarosa al 1.0% teñido con Midori Green DNA stain. La electroforesis se realizó en buffer TBE 0.5X durante 50 minutos a 80 V.

El gel se documentó bajo luz ultravioleta en el transiluminador BIO RAD molecular Imager® con el programa Gel Doc™ XR + and ChemiDoc utilizando como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

### 5.6.4 Cuantificación y pureza del DNA

Se realizó la lectura de absorbancia del extracto de DNA en el espectrofotómetro NANODROP LITE (Thermo Scientific), a 260 nm (longitud de onda a la cual absorben los ácidos nucleicos), también se obtuvo la lectura de la relación  $A_{260}/A_{280} = 1.7$  a 2.0 como indicador de la pureza del extracto.

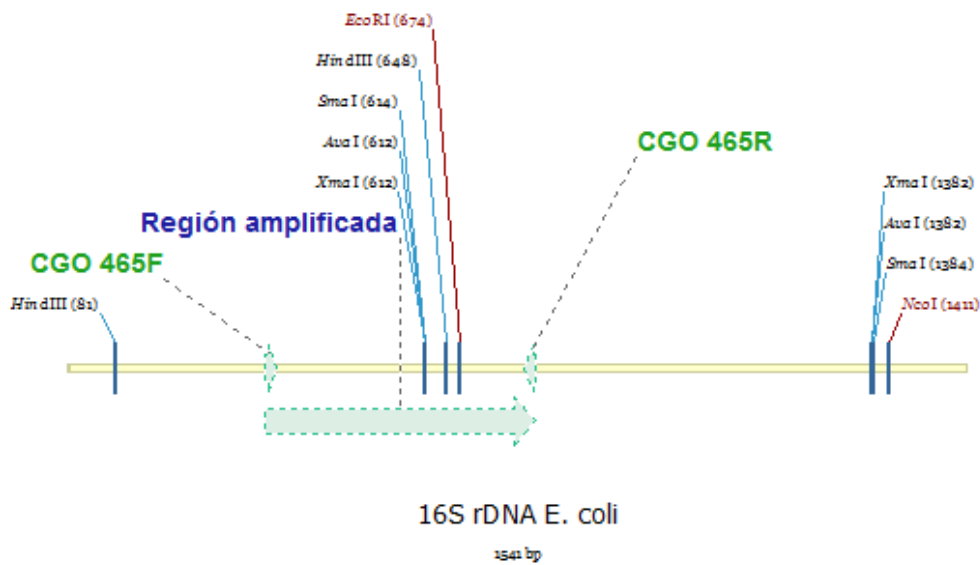
### 5.6.5 Amplificación de la región 16s rDNA bacteriano por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos (oligos o primers) iniciadores CGO 465F (forward o directo) cuya secuencia es CTCCTACGGGAGGCAGCAG y CGO 465R (reverse o reverso) cuya secuencia es CTACCAGGGTATCTAATCCTG fueron diseñados con anterioridad por el grupo de trabajo, estos comprenden las regiones hipervariables V3 y V4 de la sección intermedia del gen 16S rRNA (Neef *et al.*, 1990) y para cuyo diseño se tomó en cuenta un conjunto de secuencias de 16S rDNA reportadas para una variedad de especies bacterianas en GeneBank (NCBI). También se contó con el oligonucleótido CGO465F-GC que contiene la secuencia del oligonucleótido directo CGO465F que contiene la secuencia del oligonucleótido directo CGO465F unida a una pinza de 40 guaninas y citosinas en el extremo 5' (secuencia de la pinza de GC's: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG). Este fue utilizado en la obtención de los productos de PCR sometidos a electroforesis desnaturizante (DGGE) debido a lo reportado por Muyzer esta pinza disminuye



la velocidad de migración incrementando la eficiencia de resolución de las bandas (Muyzer *et al.*, 1993).

CGO465F Y CGO465R se alinean con los nucleótidos 332-350 para el gen de *E. coli* (Figura 7) mientras que el oligo CGO465R se alinea con los nucleótidos 775-795 del mismo gen para dar un producto de 465 pb.



**Figura 7.** Unión de los primers CGO 465F y CGO 465R a la secuencia del *E. Coli* (gen 16S rDNA GenBank: J01859.1)

Se preparó la mezcla de reacción de PCR en un área estéril para un volumen final de 25  $\mu$ l considerando las concentraciones de los reactivos descritas en la Tabla 9

**Tabla 9.** Composición de la mezcla de reacción para amplificar 16S rDNA bacteriano

Sustancia	[Stock]	[Reacción]	µl por reacción
Agua			16.9
Buffer sin Mg	10 X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2mM	2.0
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Taq Polimerasa	5 U/µl	0.02 U/µl	0.1
CGO 465F-GC	10 µM	0.2 µM	0.5
CGO 465R	10 µM	0.2 µM	0.5
DNA		100 ng	2.0

Se prepararon diluciones de los extractos de DNA de cada muestra (cuando fue necesario) para asegurar la presencia inicial de 2 ng/µl de DNA en cada reacción de PCR. El protocolo de temperaturas para la reacción se describe en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Protocolo de temperaturas para amplificación por PCR de fragmento del gen 16S rDNA con pinza de GC

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	95°C	45 segundos	} 25
Alineamiento	55°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Una vez completado el protocolo de temperaturas en el termociclador TECHNE (TC-312) se confirmó la amplificación, tamaño y especificidad del producto por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Midori Green DNA stain. La electroforesis se realizó en buffer TBE 0.5X durante 50 minutos a 80 V. El gel se documentó bajo luz ultravioleta en el transiluminador BIO RAD molecular Imager® con el programa Gel Doc™ XR + and ChemiDoc. Se utilizó como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).



Para cada una de las muestras se preparó un pool de 25 reacciones de 25  $\mu$ l (volumen final de 500  $\mu$ l) y se cuantificó por espectrofotometría UV para cargar y fijar las condiciones de electroforesis en el gel analítico de DGGE. Posteriormente, se prepararon nuevos lotes de 10 reacciones de las muestras seleccionadas para cargar los geles preparativos de DGGE.

### **5.6.6 Fraccionamiento electroforético en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de amplicones obtenidos por PCR**

La manufactura de los geles de poliacrilamida se realizó usando el sistema DCode Universal Mutation Detection System (Bio Rad®). El producto de PCR se fraccionó por DGGE, en geles de poliacrilamida al 8% (Acrilamida: Bisacrilamida 37.5:1) con un gradiente desnaturizante de 25:70% para productos de PCR de Eubacterias.

#### **5.6.6.1 Preparación de las muestras**

Se preparó una mezcla de 1:1 (v/v) de amplicón (del pool de PCR de cada muestra) y buffer de carga 2X (70% glicerol, 29.98% TAE 1X y el 0.02 % azul de bromofenol), se homogeneizó y se centrifugó brevemente, la muestra se cargó por la parte superior del equipo en los carriles designados utilizando puntas de capilaridad. La electroforesis se corrió durante 20 horas a 60V. La concentración del amplicon fue de 20  $\mu$ g por carril.

#### **5.6.6.2 Tinción y documentación de los geles de DGGE**

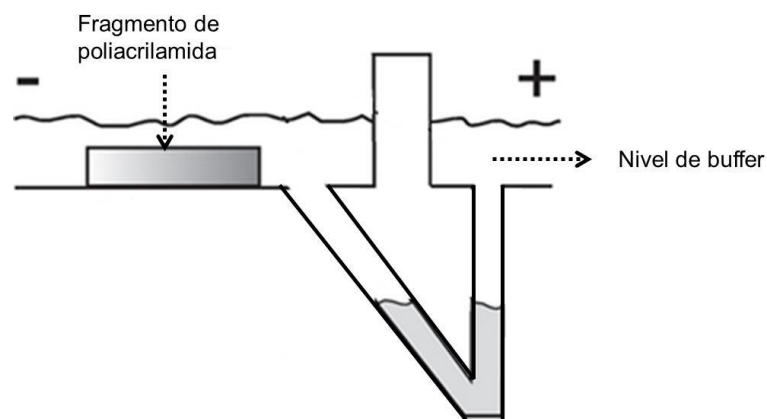
Una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis los geles fueron teñidos con una solución de Sybr Green (1:10'000), la tinción se llevó a cabo durante 15 minutos con agitación constante posteriormente el gel se destiño con 250 mL de agua destilada durante 15 minutos con agitación. El gel se documentó bajo luz ultravioleta en el transiluminador BIO RAD molecular Imager® con el programa Gel Doc™ XR + and ChemiDoc.

### **5.6.7 Recuperación del DNA (Fragmento del gen 16S rDNA) fraccionado en gel de poliacrilamida por el método de electroelución**

Se elaboró el gel de DGGE preparativo (un solo pozo) con un gradiente lineal desnaturizante de 25-70%, se cargaron 120  $\mu$ g de producto de PCR purificado

de las muestras seleccionadas y se realizó la electroforesis. Posteriormente, se tiñó el gel con solución de SybrGreen®. Se colocó el gel bajo la luz UV en un transiluminador y rápidamente se cortaron las bandas seleccionadas con una navaja, cada banda se cortó en pedazos más pequeños y se colocó en un tubo de polipropileno de 1.5 mL

La cámara de electroelución se llenó con buffer TBE 1X (45 mM tris-borato y EDTA 1mM) suficiente para cubrir los pozos y se colocaron 200 µl de solución para electroeluir (acetato de sodio 2.7 M con 1 µl de solución concentrada de azul de bromofenol por cada mL de acetato) en cada conducto posterior evitando la formación de burbujas dentro de la trampa (Figura 8)



**Figura 8.** Esquema de una cámara de electroelución

Cada banda fragmentada se colocó en un pozo del equipo y se conectaron los cables a la fuente de poder y a la cámara asegurando el polo positivo al final de la trampa de acetato. Se permitió la electroelución durante 45 minutos a 100V siguiendo el movimiento del DNA con la lámpara de luz UV portátil.

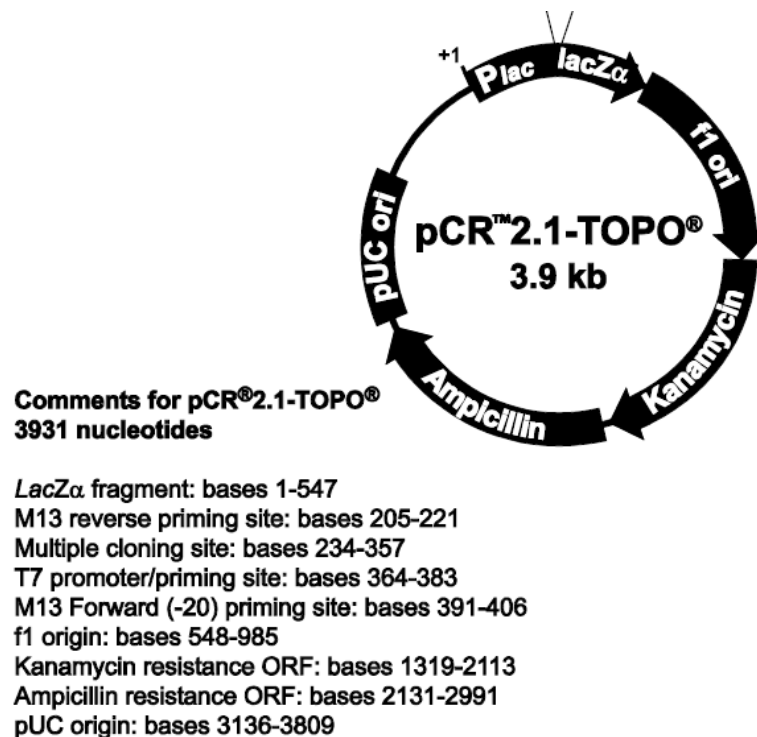
Se recuperaron 500 µl de la solución del conducto anterior y se adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1) homogeneizando la mezcla. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a velocidad máxima y la capa superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo. El DNA se precipitó adicionando 1 mL de etanol absoluto centrifugando a 12 000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Se decantó el etanol y se lavó la pastilla de DNA con 500 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 12000rpm durante 15 minutos. Se decantó el



etanol y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente invirtiendo el tubo sobre papel absorbente. Finalmente se re suspendió la pastilla en 20 µl de agua grado PCR y se cargaron 2 µl en gel de agarosa al 1.5% para corroborar la presencia de DNA. Se almacenó a -20°C para posteriores usos.

### 5.6.1 Clonación de un fragmento del gen 16S rDNA en vector PCR™ 2.1-TOPO recuperado de un gel de DGGE por electroelución

Se utilizó el plásmido PCR™ 2.1-TOPO para clonar productos de PCR recuperados de un gel preparativo de DGGE que cuenta con un método de selección positiva al recircularizarse, que acepta insertos hasta de 10 kilobases y que contiene un gen de resistencia a ampicilina y a kanamicina para la selección de pos-transformantes. En la Figura 9 se muestra el mapa del vector.



**Figura 9.** Mapa del vector PCR™ 2.1-TOPO



### 5.6.1 Ligación

La reacción de ligación se describe en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Componentes de la mezcla de reacción de ligación

Componente	Cantidad
Producto de PCR	0.5 – 4.0 $\mu$ l
Solución salina	1 $\mu$ l
Agua	Agregar a un volumen de 5 $\mu$ l
Vector PCR™ 2.1-TOPO	1 $\mu$ l
Volumen final	6 $\mu$ l

### 5.6.2 Transformación

Se agregaron 2  $\mu$ l de reacción de ligación a 50  $\mu$ l de células químicamente competentes (*Escherichia coli* Top 10F', provistas con el kit) y se incubaron por 5 minutos en hielo. Se aplicó shock térmico exactamente por 30 segundos a 42°C y se incubó en hielo durante 2 minutos para permitir la recuperación. Se adicionaron 250  $\mu$ l de medio SOC (provisto en el kit) y se incubó durante 1 hora a 37°C a 200 rpm.

Se espatuló 50  $\mu$ l de las bacterias transformadas en cajas de medio sólido LB selectivo con kanamicina 50  $\mu$ g/mL, 40  $\mu$ l X-gal (40mg/mL) y 40  $\mu$ l de IPTG (100 mM); el X-gal y el IPTG son requeridos para la selección de colonias blancas/azules, las colonias blancas son las que contienen el inserto de PCR. Se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche. Las colonias blancas se sembraron en cajas de LB Kanamicina (50 $\mu$ g/mL). Se aislaron por el método de estría entre 3 y 6 colonias de cada banda clonada y posteriormente se procedió a la extracción del DNA plasmídico.

### 5.6.3 Extracción de plásmido por el método de lisis alcalina

1. Inocular 5 ml de medio LB-Kanamicina (50  $\mu$ g/mL) con una sola colonia de bacterias transformadas. Incubar toda la noche a 37 °C y 200 rpm.
2. Centrifugar el cultivo en un tubo de propileno de 1.5 mL para empastillar y desechar el sobrenadante.



3. Adicionar 150  $\mu$ l de la Solución I [Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 Mm (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0)] y mezclar vigorosamente en vórtex (asegurarse de que no queden grumos), incubar 5 minutos en hielo.
4. Agregar 100  $\mu$ L de la Solución II [NaOH 0.2N, SDS 1% (preparar al momento)], mezclar el contenido invirtiendo el tubo rápidamente 5 veces.  
Nota: No agitar en vortex. Incubar en hielo por 5 minutos.
5. Adicionar 200  $\mu$ L de la Solución III [60 mL de acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial, 28.5 mL de agua) e incubar 5 minutos en hielo.
6. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Recuperar 450  $\mu$ L de sobrenadante y transferir a un tubo nuevo.
7. Añadir RNAsa [Stock 10 mg/mL] a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
8. Agregar 200  $\mu$ L de fenol/ 200  $\mu$ L de cloroformo, posteriormente centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos
9. Tomar la fase acuosa (400  $\mu$ l) y transferir a un tubo limpio.
10. Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto (800  $\mu$ L) + 1/10 acetato de sodio 3M (40  $\mu$ L). Centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C y decantar
11. Agregar 1 volumen de etanol al 70%, Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C y decantar
12. Secar la pastilla y re suspender en 100  $\mu$ L de agua grado PCR.

Tomar 2  $\mu$ L para correr en gel de agarosa al 1% y cuantificar a 260nm

#### **5.6.4 Confirmación por PCR de inserto en el plásmido PCR<sup>TM</sup> 2.1-TOPO**

Se realizó PCR confirmatoria para el producto de ligación en el vector PCR<sup>TM</sup> 2.1-TOPO componentes de la mezcla de reacción de volumen final de 20  $\mu$ l se describen en la Tabla 12, el protocolo de temperatura se describe en la Tabla 13.



**Tabla 12.** Composición de la mezcla de reacción para amplificar por PCR el fragmento de 16s rDNA bacteriano clonado en el vector PCR™ 2.1-TOPO

Sustancia	[Stock]	[Reacción]	µl por reacción
Agua			30.8
Buffer sin Mg	10 X	1X	5.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 mM	10.0
dNTP's	10 mM	0.2 mM	1.0
Taq Polimerasa	5 U/µl	0.02 U/ µl	0.2
M13 F (-20)	10 µM	0.2 µM	1.0
M13 R	10 µM	0.2 µM	1.0
DNA		100 ng	1.0
		Volumen total de rx	50.0

**Tabla 13.** Protocolo de temperatura para la amplificación por PCR del fragmento de 16s rDNA clonado en el vector PCR™ 2.1-TOPO

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	10 minutos	} 25
Desnaturalización	94°C	30 segundos	
Alineamiento	53.2°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	

Una vez completado el protocolo de se confirmó la amplificación, tamaño y especificidad del producto por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Midori Green DNA stain. La electroforesis se realizó en buffer TBE 0.5X durante 50 minutos a 80 V. El gel se documentó bajo luz ultravioleta en el transiluminador BIO RAD molecular Imager® con el programa Gel Doc™ XR + and ChemiDoc. Se utilizó como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

### 5.6.5 Reacción de secuenciación del fragmento de 16S rDNA clonado en el vector pCR®4-TOPO®

Se realizó la reacción de secuenciación por PCR utilizando el kit big dye terminator cycle sequencing v.1.1 para un volumen final de 20 µl. Por cada muestra de DNA se preparó dos reacciones, cada uno de los oligos iniciadores para pCR®4-TOPO®. Para la reacción se requiere que el DNA plasmídico esté puro y libre de RNA. Los componentes de la mezcla y el protocolo de





temperaturas para la reacción de la secuenciación se describen en la Tabla 14 y Tabla 15 respectivamente.

**Tabla 14.** Composición de la mezcla de reacción para secuenciar

Sustancia	[Stock]	[Reacción]	µl por reacción
Agua			15
Buffer de secuenciación	5 X	0.5 X	2.0
Mix para secuenciar	20 X	1.0 X	1.0
M13 F (-20)/M13 R	10 µM	0.2 µM	1.0
DNA	Variable	100 ng	1.0

**Tabla 15.** Protocolo de temperatura para la reacción de la secuenciación de inserto en el vector pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	96°C	1 minuto	} 25
Desnaturalización	96°C	10 segundos	
Alineamiento	50°C	5 segundos	
Extensión	60°C	4 minutos	

Se llevó a cabo la precipitación con EDTA-EtOH para la limpieza de las reacciones de secuenciación como se describe a continuación

1. Centrifugar brevemente la reacción de secuenciación
2. Transferir la reacción a un tubo de 1.5 mL
3. Agregar 5 µL de EDTA 125 mM pH 8 y 60 µL de EtOH absoluto
4. Mezclar lentamente. Centrifugar brevemente para bajar y dejar 30 min a temperatura ambiente
5. Centrifugar 20 minutos a máxima velocidad 14000 rpm, cuidando de marcar orientación del tubo
6. Remover sobrenadante con punta inmediatamente después de centrifugar (si se pasa el tiempo se debe volver a centrifugar). Eliminar todo el líquido posible.
7. Lavar con 250 µL de EtOH al 70%



8. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad 14000 rpm con el tubo en la misma orientación que el paso 5
9. Repetir paso 7 y 8
10. Remover con punta todo el sobrenadante y dejar secar

Las reacciones de secuenciación se procesaron en la unidad de ácidos nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV unidad Zacatenco, por el método de electroforesis capilar con el sistema ABI PRISM 310 de Applied Biosystems.

#### **5.6.6 Análisis de los electroferogramas y asignación de filogenia**

Los electroferogramas obtenidos en el formato AB1 se depuraron con ayuda del programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 de acceso libre. Se llevó a cabo la inspección de las secuencias y un alineamiento local con el programa vector NTI 6 (inforMax, Inc. 1994-2000). Cada secuencia obtenida se comparó con la base de datos del NCBI a través de su herramienta en línea BLAST para ácidos nucleicos en el apartado 16S rDNA para las bacterias reportadas.

#### **5.7 Secuenciamiento masivo usando la Plataforma Ion Torrent (PGM)**

El DNA genómico de las muestras provenientes del reactor inoculador sulfato-reductor y del reactor de suelos activados a diferentes días de operación fue extraído usando el kit de extracción PowerSoil® DNA (MoBio), se siguieron las instrucciones del kit. El DNA extraído fue amplificado con los oligos de la región V3 del 16S rDNA. El oligo directo (forward) fue V3-341F y el oligo reverso (reverse) V3-518R que contenían los adaptadores para el secuenciamiento masivo (Fierer *et al.*, 2008; Whiteley *et al.*, 2012). El mix de PCE consistió de Buffer (1X), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), dNTP's (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (0.025U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), oligo directo V3-341F (0.2 $\mu\text{M}$ ), oligo reverso V3-518R (0.2 $\mu\text{M}$ ) y DNA molde (10 ng). La amplificación se llevó a cabo en el termociclador Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo como se describe a continuación: Desnaturalización inicial (95°C durante 5 min), seguido por 30 ciclos de desnaturalización (94°C durante 15 s), alineamiento (62°C durante 15 s), extensión (72°C durante 15 s) y extensión final (72°C durante 10 min). Los productos de PCR fueron purificados utilizando el Wizard SV Gen PCR



Clean-up System Kit (Promega) y por fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa 2%. La concentración de los amplicones de PCR fueron medidos utilizando el equipo NanoDrop (ThermoScientific). Para obtener la concentración y el tamaño promedio de cada amplicon de la biblioteca genómica, la cantidad de fragmentos de DNA por microlitro fue calculada utilizando el equipo Agilent Bioanalyzer 2100 y se llevaron a cabo las diluciones necesarias para obtener una concentración final de 26 pM antes de llevar a cabo la amplificación clonal. La PCR de emulsión se llevó a cabo utilizando Ion One Touch TM200 template Kit V2 DL (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante, posteriormente se llevó a cabo el enriquecimiento del amplicon con perlas (Ion Spheres) utilizando el Ion One Touch ES. El secuenciamiento se llevó a cabo usando un Chip de 316 en el Ion Sequencing 200 bp kit (Life Technologies) acorde al protocolo de manufactura (Ion Xpress\_ Plus gDNA and Amplicon Library Preparation, Life technologies).

Después del secuenciamiento, las secuencias obtenidas fueron filtradas utilizando el software PGM para eliminar las secuencias policlonales y de baja calidad, posteriormente se utilizó el software Torrent-Suite V 4.0.2 del Ion Torrent PGM para llevar a cabo el proceso de demultiplex de las secuencias en base a sus MIDs. Los datos fueron exportados con formato Fastq. Posteriormente fueron analizados usando el software QIIME versión 1.8.0 (Caporaso *et al.*, 2010). Los datos con formato Fastq fueron convertidos a formato Fasta y todos los datos (demultiplexados) fueron concatenados en un solo documento Fasta. Las referencia de las unidades taxonómicas operacionales (OTU) fueron determinadas a un nivel de similitud de 97% con el algoritmo UCLUST (Edgar, 2010). Las quimeras fueron detectadas y removidas del dataset utilizando el Chimera Slayer (Haas *et al.*, 2011). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo utilizando la base de datos de Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006). La abundancia de los grupos de bacterias a diferentes niveles taxonómicos (filo, género) se exploró separadamente con un análisis de componentes principales.

## 6 Resultados y Discusión

### 6.1 Actividad 1. Reactores inoculadores en ambiente metanogénico y sulfato-reductor.

Los reactores inoculadores se aclimataron al lindano, se alimentaron con 7 mg/L de lindano, con una carga volumétrica de 0.3mg lindano/L-d.

El pH en los dos reactores se mantuvo por arriba de 7, (Tabla 16). Brock y Madigan (1991) reportaron que el pH óptimo para el crecimiento de los microorganismos está entre 6 y 8. El pH óptimo para el crecimiento de los microorganismos metanogénicos es de 6.5 a 7.5 (Jantsch and Mattiasson, 2004).

**Tabla 16.** Comportamiento de los parámetros fisicoquímicos determinados en los reactores inoculadores

Parámetro	RI-M	RI-SR
pH (-)	7.69 ± 0.25	8,02 ± 0.30
$\eta_{DQO}$ (%) <sup>a</sup>	67 ± 23	59 ± 21
$\eta_{Lindano}$ (%) <sup>b</sup>	91 ± 4.5	80 ± 18.2
SSV (mg biomasa/L)	1463 ± 596	1893 ± 856
Factor $\alpha$	0.20 ± 0.09	NA
$\eta_{Sulfatos}$ (%) <sup>c</sup>	NA	76.47 ± 7.85
CH <sub>4</sub> (%)	44.66 ± 23.09	32.84 ± 16.18

**Notas:** <sup>a</sup> Eficiencia de remoción de materia orgánica como DQO; <sup>b</sup> Eficiencia de remoción de lindano; <sup>c</sup> Eficiencia de remoción de sulfatos; <sup>d</sup> No aplicable.

Con respecto a la remoción de materia orgánica en los dos reactores inoculadores, el mayor porcentaje de remoción se presenta en el reactor metanogénico (67%) con respecto al reactor sulfato reductor (59%). Estos resultados son comparables con lo reportado por Robles-González *et al.* (2008b), la remoción de materia orgánica en reactores inoculadores (aclimatados a lindano) fue de 77 y 71 % para el RI-M y RI-SR respectivamente. Kipopoulou *et al.* (2004) evaluaron la remoción de lindano en una planta de tratamiento de aguas residuales utilizando lodos activados, obteniendo 73-96% de remoción de materia orgánica.



El reactor inoculador metanogénico mostró mayor remoción de lindano 91% comparado con 80% que presentó el reactor inoculador sulfato reductor. En condiciones anaerobias Boyle *et al.* (1999) reportan 90% de remoción de lindano utilizando bacterias sulfato-reductoras de sedimentos marinos. En un experimento similar a éste Robles-González *et al.* (2008b) observaron 65.2 y 80.1 % de remoción de lindano en RI-M y RI-SR respectivamente.

Nagata *et al.* (1999) reportaron que el lindano puede ser utilizado por *Sphingomonas paucimobilis* como única fuente de carbono y energía, sin embargo, en algunos casos, los microorganismos son incapaces de metabolizar compuestos xenobióticos como fuente de carbono y energía, pero pueden transformar dicha sustancia si se les aporta un sustrato de crecimiento alternativo (cometabolismo, Morri *et al.*, 1997). En la presente investigación se utilizó como co-sustrato sacarosa para los RI's anaerobios.

El coeficiente alfa se determinó en el reactor inoculador metanogénico, debido a que este factor indica la capacidad amortiguadora del medio y es una herramienta útil para el monitoreo de reactores anaerobios metanogénicos. El valor de  $\alpha$  se incrementa rápidamente cuando el sistema sufre una perturbación acidógena y disminuye cuando el sistema se recupera (Poggi-Varaldo and Oleszkiewicz, 1992)

En la Tabla 16 se observa que el valor del factor alfa se encuentra por debajo de 0.5 lo cual indica que el reactor tiene un buen régimen anaerobio (Ripley *et al.*, 1986).

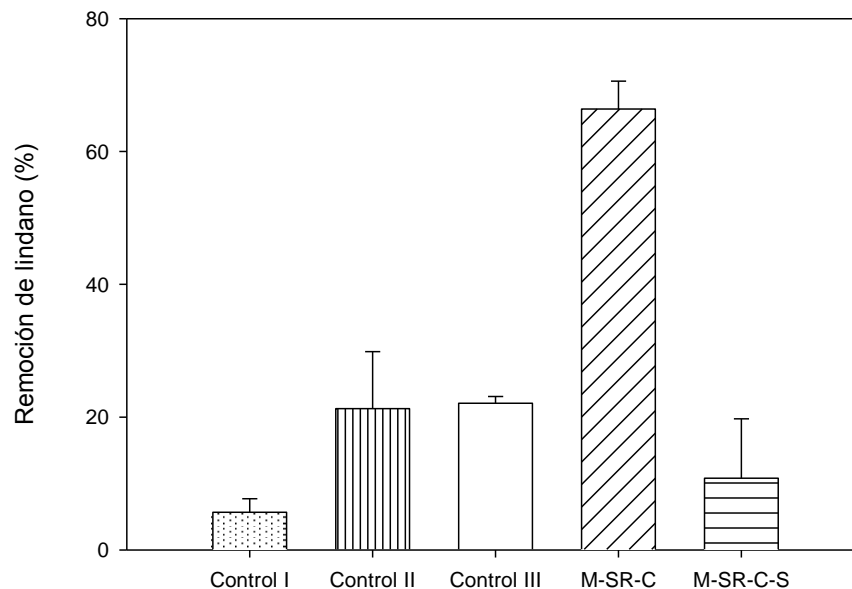
En la Tabla 16, se observa que la remoción de sulfatos no se vio inhibida por el contaminante. Boyle *et al.*, (1999) reportan que la deshalogenación del lindano puede estar acoplada a la sulfato-reducción, las cuales utilizan el sulfato como aceptor de electrones.

## 6.2 Actividad 2. Evaluar el desempeño de reactores de suelos activados en ambientes secuenciales: metanogénico/sulfato-reductor utilizando tratamiento extractivos con solvente (aceite de silicona)

### 6.2.1 Remoción de lindano

En esta etapa se evaluó en efectos de la adición de solvente y de la bioestimulación con sacarosa sobre la remoción de lindano.

La degradación de lindano después de 30 días se muestra en la Figura 10. En donde se observa que la presencia de aceite de silicona no tiene un efecto positivo sobre la remoción de lindano. La remoción obtenida en los RSA M-SR-C-S fue de 11% comparado con 66% para el M-SR-C. Con respecto a los controles, el control I presentó remoción de 6%, el control II mostró 21%, el control III alcanzó 22% de remoción de lindano después de 30 días de incubación, se observa que los microorganismos aclimatados a lindano fueron capaces de sobrevivir a la presión selectiva de los microorganismos nativos del suelo. Podemos observar que la unidad activa M-SR-C presentó mayor remoción.



**Figura 10.** Degradación de lindano en reactores de suelos activados metanogénico/sulfato-reductor, después de 30 días. Símbolos: sin solvente RSA-M-SR-C, con solvente RSA-M-SR-C-S, control abiótico, suelo contaminado estéril + inóculo estéril, Control I, control biótico, suelo contaminado sin esterilizar + inóculo estéril, Control II, Bioaugmentación, suelo contaminado sin esterilizar + inóculo aclimatado, Control II



Robles-Gonzales *et al.* (2006), reportan que un suelo de textura arcilla limosa contaminado con 300 mg de ácido 2,4-(diclorofenoxi) acético (2,4-D), tratados con RSA, utilizando como aceptor de electrones  $O_2$  y  $SO_4^{2-}$ , en términos de tasa de remoción específica del herbicida a los 14 días de incubación, el RSA sulfato reductor presentó una mayor tasa de remoción específica con un valor de 9.73 mg 2,4-D/mg SSV-día comparado con el RSA aerobio con tan sólo un 2.72 mg 2,4-D/mg SSV-día. Observamos que el aceptor de electrones  $SO_4^{2-}$  presenta mejores resultados en la remociones de compuestos recalcitrantes tal es el caso en el presente trabajo y el reportado por Robles-González *et al.* (2012). Por otro lado Boophaty (2003), reportó el uso de RSA para el tratamiento de suelos contaminados con 550 mg de diésel/Kg de suelo, bajo diferentes condiciones de aceptores de electrones, sulfato reductor, nitrato reductor, metanogénico y mezcla de los aceptores de electrones antes mencionados, la remociones de diésel en 290 días de operación fueron las siguientes 80.5%, 55%, 50% y 40% para mezcla de aceptor de electrones, sulfato reductor, nitrato reductor y metanogénico respectivamente. La aportación más importante de la investigación antes citada fue la eficacia presentada en el uso de mezcla de aceptor de electrones para la remoción de hidrocarburos del petróleo, otro dato importante que las condiciones sulfato reductoras resulto ser más eficiente que en condiciones metanogénicas. Robles-González (2008), que reporta la utilización de RSA en ambiente simultaneo M/SR para el tratamiento de suelos agrícolas contaminados con lindano (100 mg/kg de suelo seco), mostraron remoción de 33.8%, además, realizaron la utilización de RSA en ambiente único, metanogénico y sulfato reductor, en donde las remociones alcanzadas después de 30 días de operación fueron 41% y 82% respectivamente, podemos observar que cuando el tratamiento fue simultaneo la remoción de lindano fue más baja que la obtenida en ambientes únicos, esto puede ser explicado por la hipótesis que existió antagonismos entre los microorganismos metanogénicos y sulfato reductores. Quintero *et al.* (2005) reportan la utilización de reactor de suelos activados en la degradación de isómeros de hexaclorociclohexano en condiciones anaerobias, inoculados con lodos anaerobios (2 g SSV/L) y como fuente de carbono utilizan ácidos grasos volátiles (2 g/L), obteniendo eficiencias de remoción de 100% para el isómero  $\gamma$ -HCH, después de 80 días de operación. Es importante destacar que el suelo tratado es un suelo arenoso, lo que facilita

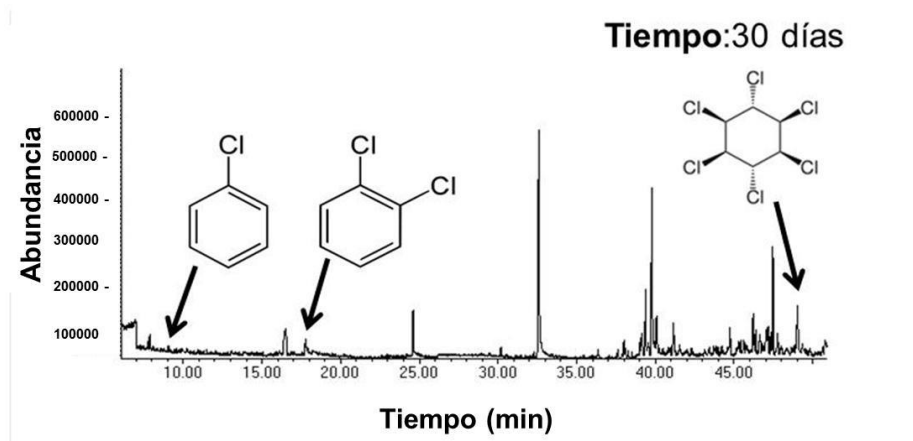
la remoción de dicho contaminante, además, la concentración de biomasa es de 2 g SSV/L comparada con 0.5 g SSV/L de inóculo utilizado en la presente investigación.

**Tabla 17.** Parámetros determinados en los reactores de suelos activados después de 15 días de operación

Muestra	pH	DQO (%)	Metano (%)	UFC
Control I	7.57 ± 0.12	21.03 ± 10.15	0	0
Control II	7.45 ± 0.01	30.67 ± 1.89	0	2.50E+05
Control III	7.44 ± 0.01	23.57 ± 1.01	11.77 ± 4.16	6.13E+06
M-SR-C	7.38 ± 0.06	18.80 ± 12.76	10.25 ± 1.20	2.67E+07
M-SR-C-S	7.03 ± 0.24	32.17 ± 7.38	15.60 ± 2.82	2.94E+07

### 6.2.2 Metabolitos intermediarios

Se llevó a cabo la determinación de metabolitos usando cromatografía de gases acoplado a masas de muestras del tratamiento de reactores de suelos activados en ambiente secuencial metanogénico/sulfato-reductor a 30 días de operación se detectó clorobenceno y 1,2 diclorobenceno (Figura 11), metabolitos reportado en la degradación de lindano en condiciones anaerobias (Quintero *et al* 2006; Camacho-Pérez *et al.*, 2012).



**Figura 11.** Metabolitos intermediarios en el reactor de suelos activado metanogénico-sulfato reductor a 30 días de operación



**Tabla 18.** Uso de reactores de suelos activados para la biorremediación de suelos contaminados con lindano

Microorganismos	Fuente de carbón y energía/ Aceptor de electrones	Concentración inicial de $\gamma$ -HCH	Matriz	Condiciones experimentales	Metabolitos intermedarios	Remoción y velocidad de remoción	Ref.
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg SSV/L)	Sacarosa/Sulfato	100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 rpm	PCCH 1,2,4-TCB; 1,2,3-TCB; CB, B	- 88% en 30 días - 2.93 mg/kg*d	1
Inoculo aclimatado con lindano (500 mg VSS/L)	NC/Sulfato	100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 rpm	NR	- 82 % en 30 días - 2.73 mg/kg*d	1
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	Sacarosa / Sulfato	100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM Reactor trifásico: 20% v/v aceite de silicona	CB 1,2 DC 1,DCB 1,2,4-TCB	- 84% en 30 días - 2.8 mg/kg*d	2
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	NC / Sulfato	100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM Reactor trifásico: 20% v/v aceite de silicona	NR	- 78% in 30 days - 2.6 mg/kg*d	2
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	Sacarosa/dióxido de carbono	100 mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM	CB 1,2-DCB	- 47% en 30 días - 1.57 mg/kg*d	1



			contenido de material orgánica, 8%)				
Inoculo aclimatado a lindano	NC/dioxido de carbono	$\gamma$ -HCH 100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM	CB 1,2-DCB	- 41 % en 30 días - 1.37 mg/kg*d	1
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	Sacarosa/dioxido de carbono	$\gamma$ -HCH 100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM Reactor trifásico: 20% v/v aceite de silicona	NR	- 33% en 30 días - 1.1 mg/kg*d	2
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	NC/dioxido de carbono	$\gamma$ -HCH 100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM Reactor trifásico reactor: 20% v/v aceite de silicona	NR	- 22% en 30 días - 0.73 mg/kg*d	2
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	-Sacarosa - Ambiente simultaneo, Dióxido de carbono-sulfato	$\gamma$ -HCH 100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM	NR	- 16% en 30 días - 0.53 mg/kg*d	1
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	-NC - Ambiente simultaneo Dióxido de carbono-sulfato	$\gamma$ -HCH 100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 rpm	NR	- 34 % en 30 días - 1.37 mg/kg*d	1
Inoculo aclimatado a lindano	-Sacarosa - ambiente	$\gamma$ -HCH 100mg/kg	Suelo suspendido	pH 7 Vt: 100 mL	- NR	-94 % en 30 días	2



(500 mg VSS/L)	simultaneo electrón Dióxido de carbono-sulfato		(Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	120 RPM Reactor trifásico: 20% v/v aceite de silicona		- 2.17 mg/kg*d	
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	-NC - Aceptores de electrones simultaneo dióxido de carbono-sulfato	$\gamma$ -HCH 100mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 rpm Reactor trifásico Aceite de silicona: 20% v/v	- NR	-90% en 30 días - 2.17	2
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	- Sacarosa - Aceptor de electrones secuencial, dióxido de carbono-sulfato	100 mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 rpm	CB 1,2-DCB	- 66% en 30 días - 2.2 mg/kg*d	4
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	- NC - Aceptores de electrones simultaneo dióxido de carbono-sulfato	100 mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM	PCCH 1,2,4-TCB	- 98% en 30 días - 3.3 mg/kg*d	3
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	- Sacarosa - Aceptores de electrones simultáneo dióxido de carbono-sulfato	100 mg/kg	Suelo suspendido (Suelo arcilloso con alto contenido de material orgánica, 8%)	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM Reactor trifásico, Aceite de silicona 20% v/v	NR	-54% en 30 días -1.8 mg/kg*d	4
Inoculo aclimatado a lindano (500 mg VSS/L)	- NC - Aceptores de electrones simultaneo dióxido de carbono-sulfato	100 mg/kg	Aceptores de electrones simultáneo dióxido de carbono-sulfato	pH 7 Vt: 100 mL 120 RPM Reactor trifásico, aceite de silicona 20% v/v	NR	- 93% en 30 días - 3.1mg/kg*d	3



Inoculo aclimatado a lindano y paratión (500 mg VSS/L)	- NC - Nitrato	100 mg/kg Lindano 100 mg/kg paratión	Aceptores de electrones, nitrato	pH 7 Vt: 100 mL 120 rpm	NR	Lindano - 30% en 30 días - 1 mg/kg*d Paratión - 40% en 30 días -1.3 mg/kg*d	5
--	-------------------	---	----------------------------------	-------------------------------	----	--	---

Notas: HCH: gamma hexaclorociclohexano; 1,2,3.TCB:1,2,3-triclorobenceno,1,2,4-TCB:1,2,4-triclorobenceno; 1,2-DCB:1,2-diclorobenceno; 1,3-DCB:1,3-diclorobenceno; CB: Clorobenceno; DQO: demanda química de oxígeno; NC: Sin suplementación de fuente de carbono; ND: No detectado; NR: No reportado; PCCH: Pentaclorociclohexano; Vt: Volumen de trabajo; SSV: Solidos suspendidos volátiles; TCCH: Tetraclorociclohexano; THCH: hexaclorociclohexano grado técnico. Referencias: 1: Robles-González *et al.*, 2012; 2: Varo-Arguello *et al.*, 2012; Camacho-Pérez *et al.*, 2010; Camacho-Pérez *et al.*, 2012b; Cruz-Gómez, 2012



### 6.3 Actividad 4. Evaluación de la remoción de lindano y producción de bioelectricidad en un RSA-EBQ

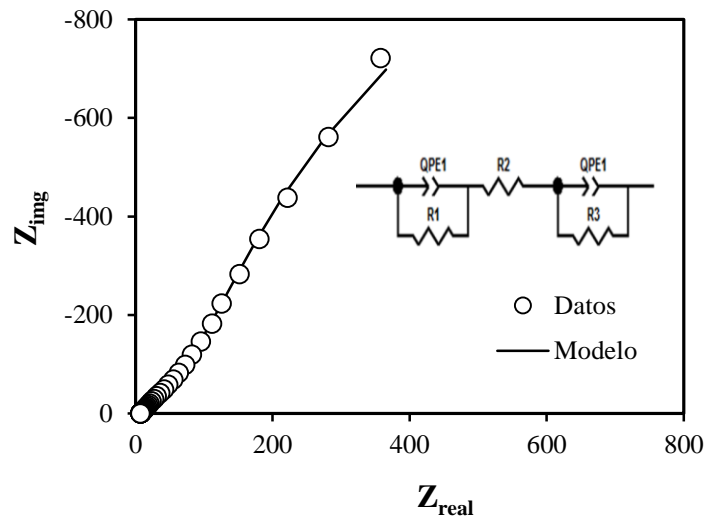
#### 6.3.1 1<sup>er</sup> Experimento (Suelo, 66%)

##### 6.3.1.1 Determinación de la resistencia interna

La resistencia interna es un factor importante en la caracterización de una CCM, donde valores bajos de resistencia interna tiende a resultados altos en la potencia generada. Por otro lado, de acuerdo al Teorema de Jacobi, “máxima potencia producida por una fuerza electromotriz”, una celda de combustible microbiana operada bajo una resistencia externa igual a su resistencia interna resultará por consecuencia en un valor de máxima potencia generada (Halliday *et al.*, 2004; Poggi-Varaldo *et al.*, 2009; Sathish-Kumar *et al.*, 2012a; Vázquez-Larios *et al.*, 2010; Vázquez-Larios *et al.*, 2011a).

El circuito equivalente obtenido del diagrama de Nyquist (Figura 12) tiene una resistencia anódica  $R_1 = 2064 \Omega$ , resistencia catódica  $R_3 = 192 \Omega$  y resistencia electrolito/membrana  $R_2 = 7 \Omega$ , la resistencia interna total fue de  $2263 \Omega$ . Comparado con otras celdas microbianas de suelo, la resistencia determinada en el presente trabajo es más baja que  $10 \text{ k}\Omega$  reportada por Ringelberg *et al.* (2011). Ellos trabajaron con un cilindro ( $2.2 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ , D x h) como reactor (Ringelberg *et al.*, 2011), trabajaron con un suelo limoso no contaminado y con 11.1% contenido de materia orgánica, el ánodo fue de tela de carbón con  $16 \text{ cm}^2$  de área de superficie y el cátodo fue de tela de carbón cubierta de un lado con  $0.5 \text{ mg}$  de Pt/ $\text{cm}^2$  (Tabla 19). Por otro lado, nuestra resistencia interna fue más alta que la reportada por Wang *et al.* (2011) y Huang *et al.* (2011). Wang *et al.* (2011) reportaron que su investigación consistió, en una celda microbiana de suelo un tubo en forma de U, el cátodo fue aireado y usaron un suelo franco limoso, los ánodos y los cátodos fueron de malla de carbón y fueron conectados entre sí en paralelo. El cátodo fue cubierto con  $0.1 \text{ mg/cm}^2$  de platino. Wang *et al.* (2011) reportaron una resistencia interna de  $1000 \Omega$ ; el suelo tratado fue contaminado con  $28.33 \text{ g}$  de hidrocarburos totales de petróleo/kg de suelo. Observaron 15% de remoción del contaminante durante 25 días de operación en lote. Por otro lado, Huang *et al.* (2011) determinaron una resistencia interna de  $100 \Omega$  en un sistema cargado con suelo de arrozal y contaminado con fenol ( $80 \text{ mg/L}$ ). El suelo fue cubierto con  $3 \text{ cm}$  de agua; el ánodo fue una capa de fieltro

de carbón (15.0 cm x 12.5 cm x 0.5 cm) y el cátodo fue tela de GORE-TEX (15.0 cm x 12.5 cm), cubierta con pintura basada en Ni (7.0 g) y una solución de Pt/C mezclada con Nafion (0.094 g). Ellos observaron 90.1% de remoción de fenol en 10 días de operación. Los resultados altos pueden ser adscrito a (i) el fenol no es fuertemente absorbido en los suelos (Poggi-Varaldo *et al.*, 2002), y (ii) el fenol puede ser degradado por una gran variedad de microorganismos y su toxicidad es relativamente baja (Singh and Fulekar, 2007; Swapna *et al.*, 2002). En contraste, el lindano es conocido por ser muy recalcitrante, toxico e hidrofóbico (Camacho-Pérez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2012).



**Figura 12.** Diagrama de Nyquist y circuito equivalente del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 1 (suelo, 66%)

**Tabla 19.** Uso de celdas de combustibles microbianas de suelo para la generación de electricidad y/o biorremediación de contaminantes

<b>Configuración del reactor</b>	<b>Características del suelo y contaminante</b>	<b>Sistema del electrodo</b>	<b>Eficiencias</b> - DQO (%) - Coulombi-métrica (%)	<b>- Voltaje</b> - <b>Potencia máxima</b> - <b>Potencia volumétrica máxima</b> - <b>Remoción del contaminante</b>	<b>Ref</b>
Cilindro: - D:2.2 cm - h: 10 cm - RE : 10k $\Omega$ - Membrana de intercambio catiónico	-Carbón orgánico:11.1% - Textura: Franco limoso	- Ánodo: Tela de carbón (8 x 1 cm), 16 cm <sup>2</sup> de área de superficie - Cátodo: Tela de carbón (8 x 1-cm) cubierta por un lado con 20% platino (0.5 mg/cm <sup>2</sup> ) - Membrana de intercambio catiónico (CMI-7000, Membranes International, Inc.)	- NR - NR	- 22mV - 0.03mW/m <sup>2</sup> - 1.27mW/m <sup>3</sup> - NA	1
- Sistema de CCM de suelo, tubo en forma de U con cátodo aireado, los electrodos fueron insertados en una membrana - RE: 1000 $\Omega$	- Textura: Franco limoso - Hidrocarburos totales del petróleo: 28.3 g/kg de suelo	- Ánodo: Malla de carbón - Cátodo: Malla de carbón, 0.1 mg/cm <sup>2</sup> Pt - Ánodos y cátodos fueron conectados en paralelo	- NR - NR	- 155 mV - 0.85 mW/m <sup>2</sup>  - 15.2 %	2



-Tubo de PVC (20cm longitud x10 cm diámetro) contenido 250 mL de suelo de arrozales. El suelo fue cubierto con 3.0 cm de agua - RE: 100Ω	- Suelos anegados - SDQO (mg/L): 430 - TCOD (mg/L): 35 500 - TOM (% , dry soil): 3.17 - Fenol : 80mg/L	-Ánodo: Una capa de fieltro de carbón (15.0cm x12.5cm x 0.5cm) -Cátodo: Tela de GORE-TEX (15.0cm x 12.5cm), cubierto con un pintura basada en Ni (7.0g) y un solución de Pt/C mezclada con Nafion (0.094g)	- NR - 3.7	- 150 mV - 29.45 mW/m <sup>2</sup> - 0.56 mW/m <sup>3</sup> - 90.1%	3
- Columnas de plexiglás (Volumen 4-L, 12cm x 35cm, d x h) con 1600g sedimento húmedo e inundando con 1L de agua - RE: 100Ω	- Sedimento - Fenantreno: 10 mg/kg sedimento seco - Pireno 5mg/kg sedimento seco	- Ánodo : Dos cilindros de acero inoxidable (80 malla x 1mm espesor) - Cátodo: Un cilindro de acero inoxidable (9.6 cm x 4cm, d x h) - No applicable	- NR - NR	-16.8 mV - 0.14 mW/m <sup>2</sup> - 1.08x10 <sup>-3</sup> mW/m <sup>3</sup> -Fenantreno: 99% - Pireno: 95%	4
- Envase de PET, Volumen 1L - RE: NR	- Suelo agrícola	- Ánodo: Tela de carbón circular, el área total geométrica fue de 81.07 cm <sup>2</sup> - Cátodo: Filtro de carbón , Diámetro de 8.8 cm, espesor de 1.27cm, 1.91 cm , tiras de tela de carbón tejidas en la parte superior - No reportado	-NR -NR	-NR - 42.49 mW/m <sup>2</sup> -	5
-Cilindro de plexiglás 6 cm de diámetro y 8 cm de	- Suelo agrícola con alto	- Ánodos: Discos de grafito (5cm D x 0.5 cm) - Cátodo: Tela de carbón toray (7cm D)	76 15	- 330 mV -25 mW/m <sup>2</sup>	6



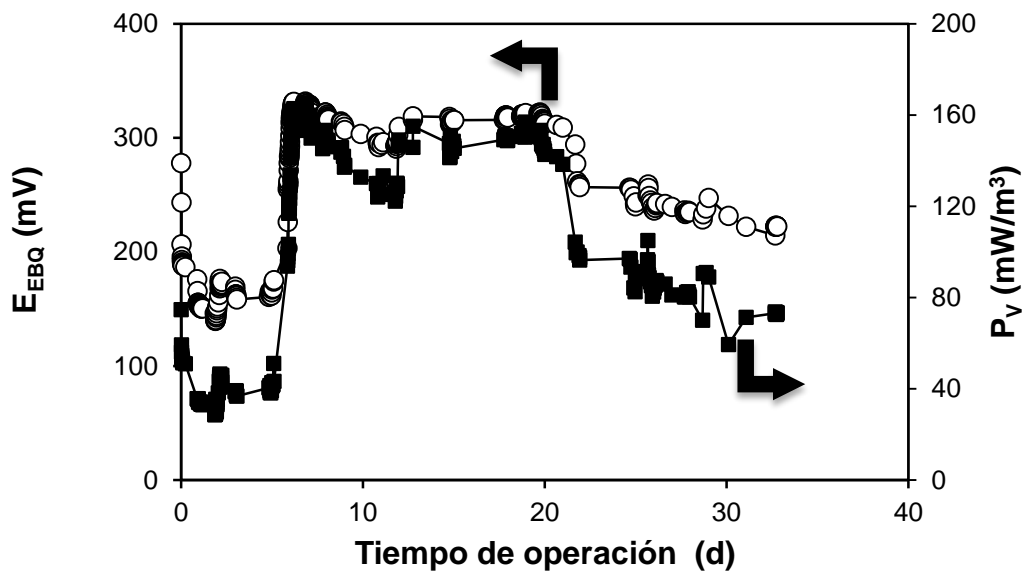


altura, volumen 308mL -RE: 560Ω	contenido de material orgánica y arcilla (8%) - Lindano: 100 mg/kg de suelo seco	- Membrana de intercambio catiónico (Nafion 117, cubierta con 0.5 mg/cm <sup>2</sup> de platino, Pt 10wt%/C-E TEK)		- 634 mW/m <sup>2</sup> - 78% - Potencia: 4.3 x 10 <sup>6</sup> J/ tonelada de suelo (30d)	
------------------------------------	--	--	--	--	--

Notas: CO: Contenido orgánico, RE: Resistencia externa, NR: No reportado. Referencias: 1. Ringelberg *et al.*, 2011; 2. Wang *et al.*, 2011; 3. Huang *et al.* 2011; 4. Yan *et al.*, 2012; 5. Dunaj *et al.*, 2012; 6. Esta investigación

### 6.3.1.2 Desempeño del reactor de suelos activados electrobioquímico

El EBQ alcanzó un voltaje aproximado de 330 mV a los 7 días de operación. (Figura 13, Tabla 20), donde la densidad de potencia normalizada por la superficie anódica fue de 6.6 mW/m<sup>2</sup> y la potencia volumétrica fue de 165 mW/m<sup>3</sup>. El voltaje permaneció constante hasta los 20 días de operación, después el voltaje bajo hasta 240 mV. La remoción de materia orgánica fue alta (72% como DQO soluble) en contraste la eficiencia coulombimétrica fue baja (5.4%).



**Figura 13.** Generación de electricidad por el reactor de suelos activados electrobioquímico durante la operación en lote durante 30 días en el Experimento 1 (suelo, 66%)

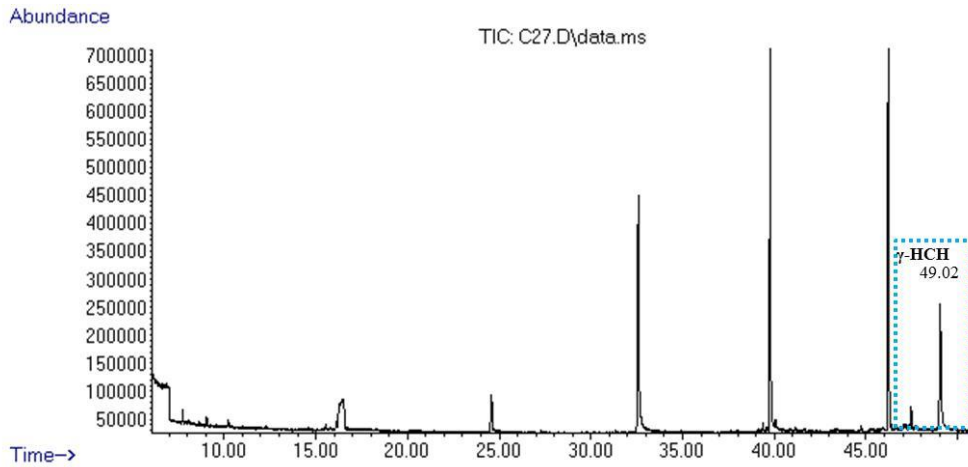


**Tabla 20.** Desempeño promedio del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 1 (suelo, 66%)

Parámetro	Valor
$\eta_{\text{Lindano}}$ (%)	30.25 $\pm$ 6.33
$P_{\text{An-max}}$ (mWm <sup>-2</sup> )	6.62
$P_{\text{V-max}}$ (mWm <sup>-3</sup> )	165.31
$E_{\text{EBQ-max}}$ (V)	0.33
$I_{\text{EBQ-max}}$ (mA)	0.15
$P_{\text{EBQ-max}}$ (mW)	0.05
$P_{\text{An-prom}}$ (mWm <sup>-2</sup> )	4.12 $\pm$ 1.35
$P_{\text{V-prom}}$ (mWm <sup>-3</sup> )	103 $\pm$ 34
$E_{\text{EBQ-prom}}$ (V)	0.26 $\pm$ 0.07
$I_{\text{EBQ-prom}}$ (mA)	0.12 $\pm$ 0.03
$P_{\text{EBQ-prom}}$ (mW)	0.03 $\pm$ 0.01
$\eta_{\text{DQO}}$ (%)	72.36 $\pm$ 15
$\eta_{\text{Sulfato}}$ (%)	22.07 $\pm$ 0.01

### 6.3.1.3 Remoción de lindano y metabolitos intermediarios

El EBQ mostró 30% de eficiencia de remoción de lindano al final de 30 días de operación en lote. Huang *et al.* (2011) observaron 90% de remoción de fenol en 10 días de operación en una celda de combustible microbiana de suelo. Nuestros resultados fueron relativamente bajos. Sin embargo debemos de considerar que el log del coeficiente de partición octanol-agua del fenol es 1.46 y el del lindano es 3.6, esto hace que el lindano sea menos biodisponible, más tóxico y menos soluble que el fenol. Además, ha sido reportado en literatura que una gran variedad de bacterias usan fenol como fuente de carbono y energía, sin embargo el lindano es menos biodegradable (Camacho-Pérez *et al.*, 2012; Quintero *et al.*, 2005; Robles-González *et al.*, 2012; Singh and Fulekar, 2007; Swapna *et al.*, 2002). Al final del tiempo de operación, no se detectaron metabolitos intermediarios por GC-MS, de la ruta de degradación de lindano (Figura 14).



**Figura 14.** Detención por GC/MS de lindano y metabolitos intermediarios en el reactor de suelos activados al final de tiempo de operación (30 días) en el Experimento 1 (suelo, 66%) (Los picos a tiempo de retención de 16.50, 24.59, 32.86, 39.77 y 46.23 minutos son Octametil-clotetrasiloxano, Decametil-ciclopentasiloxano, Dodecametil-ciclohexasiloxano, Tetradecametilcicloheptasiloxano y hexadecametil cyclooctasiloxano, respectivamente, presumiblemente de la fase de la columna).

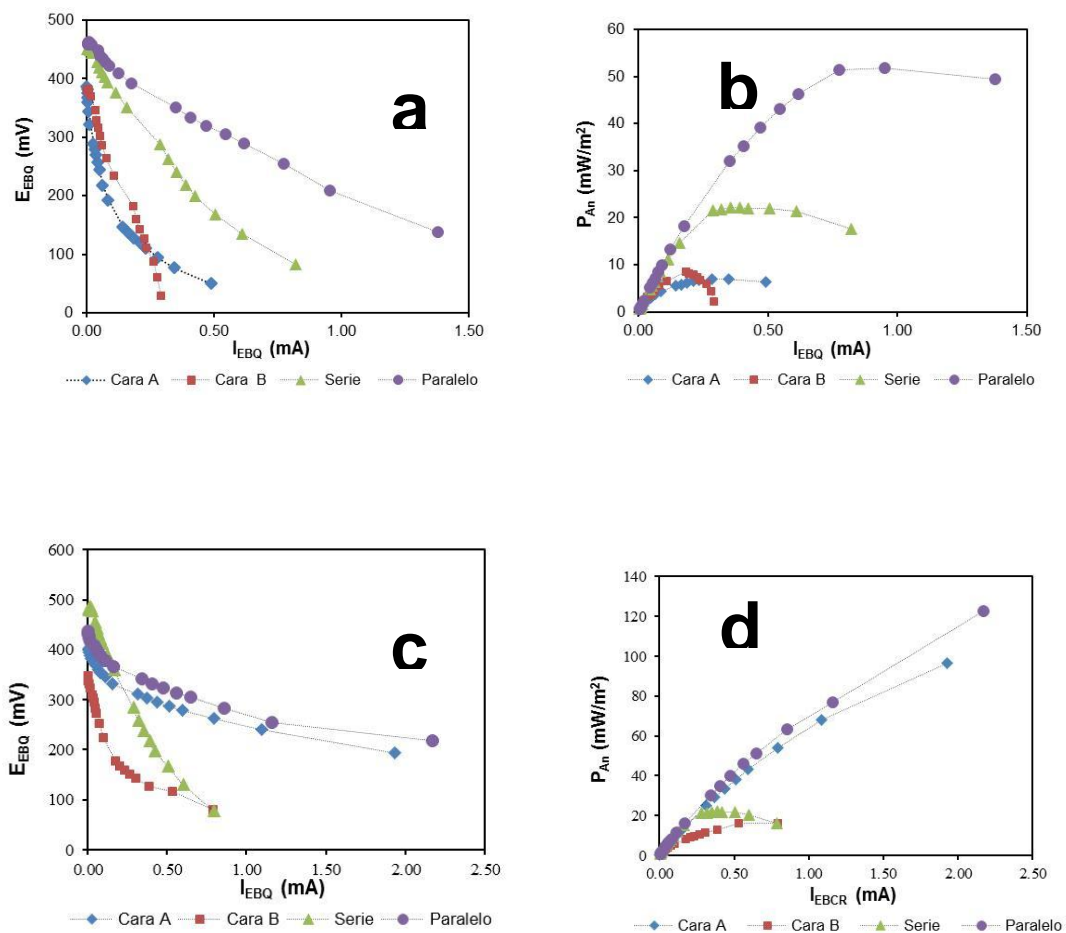
### 6.3.2 2<sup>do</sup> Experimento (Suelo, 33%)

#### 6.3.2.1 Determinación de la resistencia interna

La curva de polarización y la variación de potencia con la intensidad de corriente del EBQ a tiempo 0 días se muestran en la Figura 15a y 15b respectivamente. Los valores obtenidos por el método de la curva de polarización fueron 2046, 1288, 897 y 255  $\Omega$  para la cara A, cara B, conexión en serie y en paralelo respectivamente (Tabla 21). La potencia volumétrica máxima fue obtenida cuando la conexión fue en paralelo (739  $\text{mW}/\text{m}^3$ ) seguido por la cara B conexión en serie y cara A con 421, 340 y 86  $\text{mW}/\text{m}^3$  respectivamente.

Después de 7 días de operación se llevó a cabo otra caracterización del reactor. La resistencia interna disminuyó significativamente comparado con la primera caracterización. Los valores obtenidos fueron los siguientes 140, 339, 442, 102  $\Omega$  para la cara A, cara B la conexión en serie y en paralelo respectivamente (Figura 15c y 15d, Tabla 21). La potencia volumétrica máxima fue obtenida cuando la conexión fue en paralelo (1531  $\text{mW}/\text{m}^3$ , Tabla 21, Figura 15); esto fue dos veces mayor que la potencia volumétrica máxima obtenida en

la caracterización a 0 días. Las características mejoraron, esto puede ser una consecuencia del incremento de la actividad microbiana resultado del enriquecimiento de la biopelícula en el ánodo (Lu *et al.*, 2009). La resistencia interna fue más pequeña que 10 k $\Omega$  obtenida por Ringelberg *et al.* (2011), trabajaron con un cilindro (2.2 cm x 10 cm, D x h) como reactor, suelo franco no contaminado y con 11.1 % de contenido orgánico, el ánodo era tela de carbón con 16 cm<sup>2</sup> de área de superficie y el cátodo fue tela de carbón cubierto por un lado con 0.5 mg de Pt/cm<sup>2</sup> (Tabla 19) Ringelberg *et al.* (2011).



**Figura 15.** Caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 2 (suelo, 33%) a 0 días de operación: (a) Curva de polarización, (b) Densidad de potencia; a 7 días de operación: (c) Curva de polarización, (d) Densidad de potencia.

**Tabla 21.** Caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico a 0 y 7 días de operación, Experimento 2 (suelo, 33%)

Parámetro	Cara A		Cara B		Serie		Paralelo	
	0	7	0	7	0	7	0	7
$R_{int}$ ( $\Omega$ )	2046	140	1288	339	897	442	255	102
$P_{An-max}$ ( $mWm^{-2}$ )	6.88	96.60	33.72	16.32	13.60	13.93	29.57	61.27
$P_{V-max}$ ( $mWm^{-3}$ )	86	1207	421	204	340	348	739	1531
$I_{EBQ-max}$ (mA)	0.49	1.93	1.14	0.79	1.02	1.03	1.50	2.17
$E_{EBQ-max}$ (V)	0.39	0.41	0.38	0.35	0.45	0.49	0.46	0.44
$P_{EBQ-max}$ (mW)	0.03	0.37	0.13	0.06	0.10	0.11	0.23	0.47
$P_{An-prom}$ ( $mWm^{-2}$ )	2.72	19.91	6.13	5.88	5.08	4.95	0.87	12.12
$P_{V-prom}$ ( $mWm^{-3}$ )	34	249	76	73	127	124	22	303
$I_{EBQ-prom}$ (mA)	0.09	0.30	0.15	0.15	0.20	0.19	0.02	0.33
$E_{EBQ-prom}$ (V)	0.22	0.34	0.26	0.25	0.33	0.34	0.37	0.38
$P_{EBQ-prom}$ (mW)	0.01	0.08	0.02	0.02	0.04	0.03	0.07	0.09

Notas:  $R_{int}$ : Resistencia interna;  $P_{An}$ , Densidad de potencia ánodica;  $P_V$ , Potencia volumétrica;  $E_{EBQ}$ , voltaje;  $I_{EBQ}$ , Intensidad de corriente;  $P_{EBQ}$ , Potencia. Subíndices: max, máximo; prom, promedio

Por otro lado, Wang *et al.* (2011) reportaron valores de 1000  $\Omega$ , trabajaron con una CCM de suelo con un tubo en forma de U y el cátodo fue aireado, con un suelo franco limoso, los ánodos y cátodos fueron de malla de carbón y fueron conectados en paralelo, el cátodo fue cubierto con 0.1 mg/cm<sup>2</sup> de Pt. Por otro lado la resistencia interna obtenida en nuestro trabajo cuando la conexión fue en paralelo fue similar a la reportada por Huang *et al.* (2011), determinaron una resistencia interna de 100  $\Omega$  en un sistema cargado con suelo de arrozal y contaminado con fenol (80 mg/L). El suelo fue cubierto con 3 cm de agua; el ánodo fue una capa de fieltro de carbón (15.0 cm x 12.5 cm x 0.5 cm) y el cátodo fue tela de GORE-TEX (15.0 cm x 12.5 cm), cubierta con pintura basada en Ni (7.0 g) y una solución de Pt/C mezclada con Nafion (0.094 g).

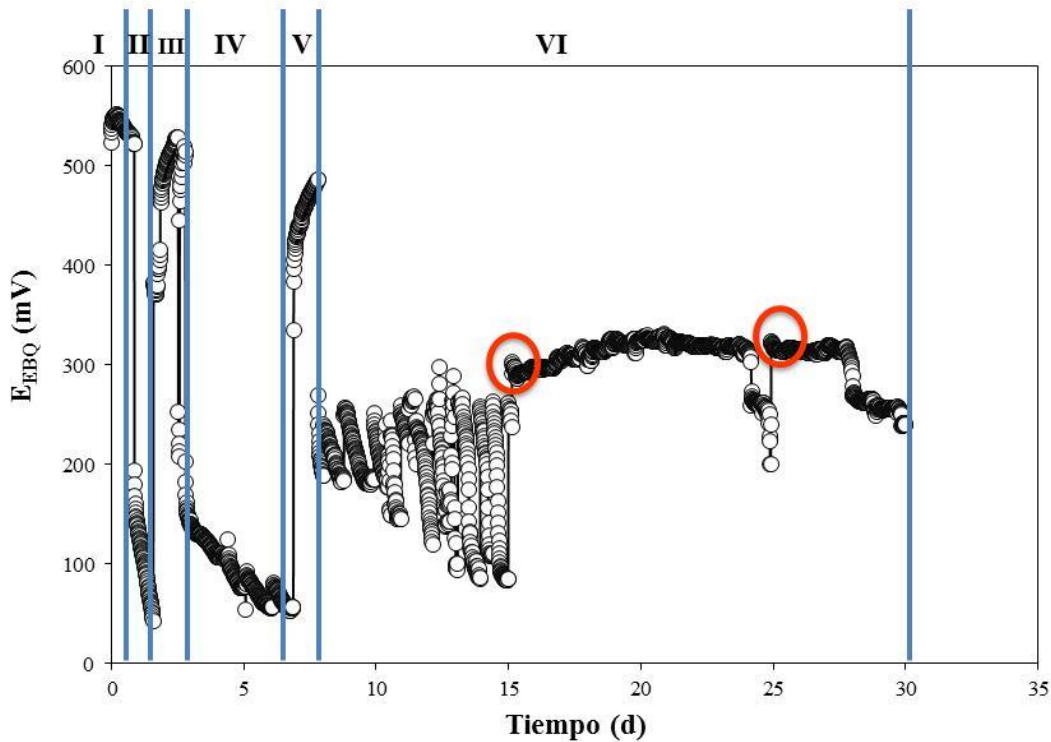
### 6.3.2.2 Desempeño de un reactor de suelos activados electrobioquímico

La Figura 16 muestra la generación de voltaje en el transcurso del tiempo del EBQ cuando los ánodos y los cátodos del EBQ fueron conectados en paralelo, mientras que el desempeño promedio se observan en la Tabla 22. El voltaje del EBQ a circuito abierto (primeras 20 horas) fue aproximadamente 530 mV (Fase I). El voltaje permaneció estable cuando el reactor fue operado con una



resistencia externa de 120  $\Omega$  (primeras horas de la fase II); sin embargo el voltaje disminuyó menos que 200 mV. Se procedió a re-establecer las condiciones de operación a circuito abierto (fase III) donde un incremento esperado de voltaje ocurrió. Subsecuentemente, en la fase IV, el reactor fue operado con una resistencia externa de 220  $\Omega$  y drásticamente se observó una disminución del voltaje. De nuevo se re-establecieron las condiciones de operación a circuito abierto (fase V). La fase VI fue operada con una resistencia externa de 560  $\Omega$ . Aproximadamente a los 8 días de operación, el contenido del reactor fue mezclado por burbujeo con nitrógeno, una vez al día durante 10 minutos (agitación neumática). Se observó que el voltaje del reactor primero incrementaba a un voltaje máximo 350 mV y luego disminuía, esta disminución fue significativa después de cada episodio de mezclado (entre 100 a 200 mV, Figura 16, día 8 a 15). Debido a las dificultades neumáticas e hidráulicas del mezclado, se decidió en el día 15 que el contenido del reactor fuera mezclado con una agitadora orbital a baja velocidad (100 rpm). Interesantemente el voltaje se estableció alrededor de 300 mV.

El cambio del tipo de mezclado fue implementado con suplementación de sustrato 2 g/L (sacarosa: acetato de sodio: lactato) que fue usado como fuente de carbono en el EBQ a 15 días de operación. La generación de electricidad inicio a incrementarse y alcanzó un voltaje de aproximadamente 303 mV (Figura 16). En este periodo, la densidad de potencia normalizada con respecto al área del ánodo fue de 21.3 mW/m<sup>2</sup> y el promedio de la potencia volumétrica fue de 531 mW/m<sup>3</sup>. Aproximadamente 20 días de operación, el reactor alcanzó un voltaje máximo de 329 mV y la potencia volumétrica de 629 mW/m<sup>3</sup> (Tabla 22); el voltaje remanente se mantuvo constante hasta el día 24. Después, el voltaje disminuyó de nuevo a 260 mV. En el día 25 el EBQ fue alimentado con 2 gDQO/L de sustrato y alcanzó un voltaje de 321 mV, a 28 días de operación el voltaje disminuyó a 280 mV. El voltaje máximo fue de 330 mV y la potencia máxima de 25 mW/m<sup>2</sup>, las cuales fueron más altas que las reportadas por Wang *et al.* (2011), 155 mV y potencia máxima de 0.85 mW/m<sup>2</sup>, para una celda cargada con suelo contaminado con hidrocarburos totales del petróleo (Tabla 19).



**Figura 16.** Generación de electricidad en el reactor de suelos activados electrobioquímico durante la operación en lote durante 30 días en el Experimento 2 (suelo, 33%). La adición de sustrato está indicado por los círculos rojos. Fase I, circuito abierto; Fase I, circuito cerrado con una resistencia externa de 120  $\Omega$ ; Fase III, circuito abierto; Fase IV, circuito cerrado con una resistencia de 220  $\Omega$ ; Fase V, circuito abierto; Fase VI, resistencia externa de 560 $\Omega$ .

Nuestros resultados son comparables con Yan *et al.* (2012); Yan *et al.*, (2012) reportaron un voltaje bajo de 17 mV en el tratamiento de un sedimento contaminado con fenantreno y pireno (Tabla 19). Por otro lado, Huang *et al.* (2011) registraron una densidad ligeramente superior (ca. 30 mW/m<sup>2</sup>) y un voltaje bajo (150 mV) en el tratamiento de un suelo inundado contaminado con fenol (Tabla 19).

El EBQ exhibió un bono, además de la biorremediación de suelo, la generación de bioelectricidad. Esto último fue estimado con la ecuación 3

$$\hat{E}_{producida} \text{ (MJ/tonelada de suelo)} = P_{prom} \text{ (W)} * (30 \text{ d} * 24 \text{ h/d} * 3600 \text{ s/h}) / 0.0001 \text{ tonelada de suelo} \quad (3)$$

$\hat{E}$  es la energía producida en MJ/ tonelada de suelo, donde  $P_{prom}$  es la potencia promedio en 30 días de operación, 24 h/d y 3600 s/h son factores de conversión para convertir el tiempo de días a segundos; 0.0001 toneladas de suelo es la masa de suelo en el reactor de suelos activados electrobioquímico a escala laboratorio.





**Tabla 22.** Desempeño promedio del reactor de suelos activados electrobioquímico en el Experimento 2 (suelo, 33%)

Parámetro	Valor
$\eta_{\text{Lindano}}$ (%)	78.25
$R_{\text{int}}$ ( $\Omega$ )	560
$P_{\text{An-max}}$ ( $\text{mWm}^{-2}$ )	25
$P_{\text{V-max}}$ ( $\text{mWm}^{-3}$ )	634
$E_{\text{EBQ-max}}$ (V)	0.33
$I_{\text{EBQ-max}}$ (mA)	0.59
$P_{\text{EBQmax}}$ (mW)	0.20
$\eta_{\text{Coul}}$ (%)	15.17
$\eta_{\text{DQO}}$ (%)	76.35

**Notes:**  $\eta_{\text{Lindano}}$ : eficiencia de remoción de lindano;  $R_{\text{int}}$ : resistencia interna;  $P_{\text{An}}$ , densidad potencia anódica;  $P_{\text{V}}$ , potencia volumétrica;  $E_{\text{EBQ}}$ , voltaje;  $I_{\text{EBQ}}$ , intensidad de corriente;  $P_{\text{EBQ}}$ , potencia;  $\eta_{\text{Coul}}$  (%): Eficiencia coulombimétrica.  $\eta_{\text{DQO}}$ , eficiencia de remoción de materia orgánica como DQO; Subíndices: max, máximo; prom, promedio.

La  $\hat{E}$  fue 4.3 Mj/tonelada de suelo durante 30 días de operación. Esta energía parcialmente ofrece la potencia requerida para el mezclado del EBQ y RSA típicos. Por ejemplo, los requerimientos de potencia para el mezclado son determinados empíricamente y pueden ser estimados de las especificaciones de manufactura de los equipos. La potencia típica requerida para un mezclado completo se encuentra en el rango de 20 a 50 kW/1000 m<sup>3</sup> para suspensiones moderadamente gruesas (Eweis *et al.*, 1998). Un valor intermedio fue elegido, 35 kW/1000 m<sup>3</sup>.

Los cálculos fueron realizados con suposiciones similares a la ecuación 3, la energía requerida para mezclar durante 30 días de operación en lote, se da en la ecuación. 4.

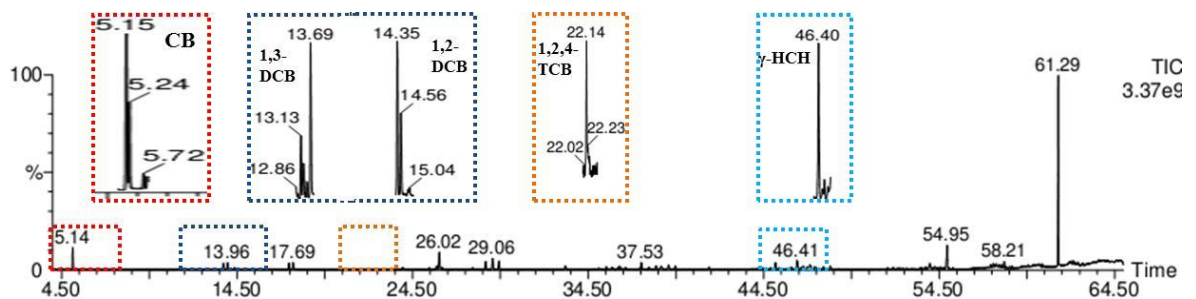
$$\hat{E}_{\text{mezclado}} = 35 \text{ (W/m}^3\text{)} * (0.33 \text{ tonelada de suelo/m}^3\text{)} * (30 \text{ d} * 24 \text{ h/d} * 3600 \text{ s/h}) = 29.9 \text{ MJ/tonelada de suelo}$$

(4)

La bioelectricidad obtenida del EBQ puede representar ca. 14% de la energía requerida para el mezclado.

### 6.3.2.3 Remoción de lindano y metabolitos intermediarios

La remoción de lindano alcanzada en el EBQ fue de 78%, la remoción de control biótico (vivo) y control abiótico fueron de 80 y 3 % respectivamente. Los principales metabolitos debido a la degradación de lindano en el EBQ fueron detectados por análisis en el GC/MS en el EBQ: 1,2,3-triclorobenceno (1,2,3-TCB), 1,3-diclorobenceno (1,3-DCB), 1,2-diclorobenceno (1,2-DCB), y clorobenceno (CB) (Figura 17).



**Figura 17.** Detención por GC/MS de metabolitos intermediarios en el reactor de suelos activados electrobioquímico al final del tiempo de operación (30 días) en el Experimento 2 (suelo, 33%).

La remoción de lindano observada en nuestro EBQ es comparada muy favorablemente con remociones de lindano reportadas en literatura para reactores de suelos activados estándar. Algunos experimentos con RSA inoculados con *Pandorea* sp., en anaerobiosis presumiblemente operado 9 semanas ha sido reportado (Okeke *et al.*, 2002). La concentración inicial fue de 100 mg/kg; ellos encontraron remociones de 59.6% de  $\gamma$ -HCH. Quintero *et al.* (2005) trataron un suelo arenoso contaminado con una mezcla de isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -HCH (100 mg/kg de cada isómero) en RSA anaerobio. Se suplemento almidón, 2 g/L cada 3 días. Encontraron remociones muy cercanas al 100% para los isómeros  $\alpha$  y  $\gamma$ -HCH y 65 a 70 % para  $\beta$  y  $\delta$ -HCH respectivamente. Por otro lado, la biorremediación de un suelo pesado contaminado con 100 mg/kg de lindano en reactores de suelos activados en condiciones sulfato-reductoras (Robles-González *et al.*, 2012). Reportaron remoción de lindano fue de 88%,

donde detectaron los siguientes metabolitos PCCH, 1,2,4-TCB; 1,2,3-TCB; CB y benceno a 30 días de operación. Robles-González *et al.* (2012) demostraron que en el reactor de suelos activados con dióxido de carbono como aceptor de electrones, la remoción de lindano fue aproximadamente de 41-47% (Tabla 6). El RSA fue operado con condiciones similares de operación (Características fisicoquímicas del suelo, pH, temperatura, agitación, concentración de suelo), excepto que en nuestra investigación se usó la tecnología de un reactor de suelos activados electrobioquímico. En otros estudios de nuestro Grupo de investigación, se han llevado a cabo experimentos con reactores de suelos activados en condiciones sulfato reductoras; se han reportados remociones de  $\gamma$ -HCH de 78 % en 30 días que fue la misma cantidad de remoción observada en nuestros experimentos usando una concentración de suelo de 33% (Varo-Arguello *et al.*, 2012).

La degradación de isómeros de HCH en los reactores de suelos activados en condiciones anaerobias fue reportado (Quintero *et al.*, 2005). En esta investigación reportan trazas de diversos metabolitos intermediarios, como son: pentaclorociclohexano (PCCH), 1,2-diclorobenceno (1,2-DCB), 1,3-diclorobenceno (1,3-DCB) y clorobenceno (CB). La baja concentración de los metabolitos indica que los compuestos intermediarios no son acumulados y ellos proceden además a la degradación a CB, producto final en el mecanismo de degradación. Por otro lado se ha observado la degradación total de  $\alpha$ -HCH en un suelo contaminado después de 3 días de incubación en ambiente anaerobio (Quintero *et al.*, 2006); en esta investigación usaron una concentración inicial de 100 mg/kg de suelo, inoculado con una concentración alta de lodos anaerobios metanogénicos (8 g SSV/L en el biorreactor), almidón (2 g DQO/L) como donador de electrones y fue operado semi-continuo. Durante la degradación, se detectaron trazas de diversos intermediarios y productos finales a lo reportado en otros trabajos (PCCH, TCCH, 1,2,3-TCB, 1,3-DCB y CB).

Se ha reportado que el lindano principalmente puede ser declorado por bacterias sulfato reductoras con generación de monoclorobenzenos y benceno como principales metabolitos intermediarios (Boyle *et al.*, 1999). Similarmente, en esta investigación se detectó clorobenceno a 30 días de operación del EBQ inoculado con inóculo sulfato-reductor. Por otro lado en nuestro Grupo de trabajo (Ortega-Martínez *et al.*, 2012) reportaron que las clonas encontradas en un



consorcio sulfato reductor fueron *Clostridia*,  $\delta$ -*Proteobacteria* (bacteria electroquímicamente activas) y *Firmicutes*, donde *Clostridia* son reconocidas como bacterias electroquímicamente activas.

La remoción alta obtenida en nuestro trabajo en solamente 30 días de operación del EBQ son muy prometedoras: este logro de remoción de lindano es similar a lo obtenido en reactores de suelos activados convencionales, sin embargo el uso de EBQ presenta un bono adicional de generación de bioelectricidad. Así, EBQ emerge como una tecnología rápida y atractiva para la degradación de plaguicidas y remediación de suelos. En efecto, esto ha sido reportado que los plaguicidas organoclorados son recalcitrantes (persistentes) en el suelo, con un promedio de vida media del orden de 2 a 5 años (García-de la Parra *et al.*, 2012; Mackay *et al.*, 1992). En particular, lindano tiene un promedio de vida media de 2.6 años en el suelo, dependiendo de las características fisicoquímicas del suelo (textura, materia orgánica, profundidad) así como las condiciones ambientales (Commission for Environmental Cooperation, 2005).

#### **6.3.2.4 Caracterización del consorcio microbiano usando el equipo Ion Torrent (PGM)**

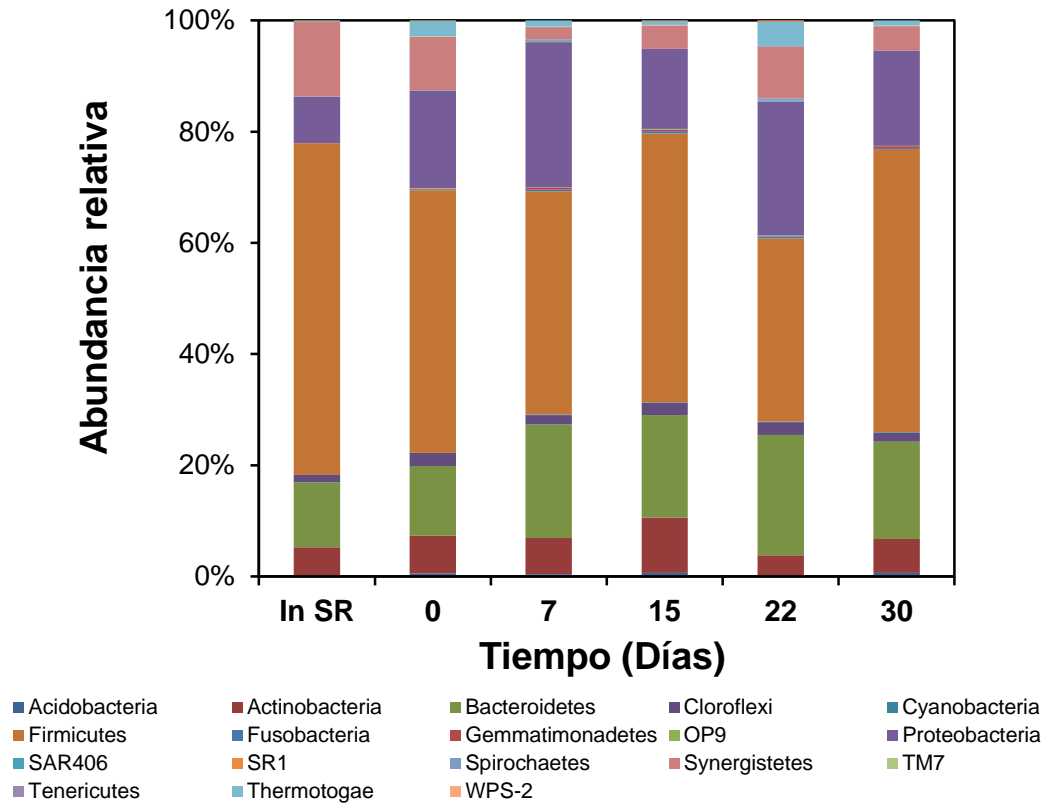
La Figura 18 muestra la composición de la comunidad microbiana obtenida del inóculo sulfato reductor y del reactor de suelos activados electrobioquímico a diferentes días de operación. Las más representativas fila (phyla) fueron Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Sinergistetes.

Kim *et al.* (2013) realizaron un análisis filogenético de muestras microbianas que revelaron una comunidad bacteriana compuesta por Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Espiroquetas. Los autores trabajaron con una celda de combustible microbiana na con el cátodo aireado, ensamble membrana-electrodo combinado en reactores tubulares. La celda microbiana fue inoculada con lodos de un digestor anaeróbico.

En el reactor de suelos activados electrobioquímico, los géneros más dominantes pertenecen a *Bacteroidetes sp.* (4.1%), *Prevotella sp.* (8.3%), *Bacteroides* (4.1%), *Prevotella* (8.3%), *Trichococcus* (8.1%), *Lachnospiraceae* (5.5%), *Faecalibacterium* (4.1%) a 30 días de operación (Tabla 22). *Trichococcus*



ha sido reportado en biocátodo autótrofos en otros sistemas bioelectroquímicos (Zaybak et al., 2013). *Trichococcus* ha sido identificado como bacteria anaerobia facultativa (Kim et al., 2013)



**Figura 18.** Identificación a nivel filo de la comunidad microbiana en el reactor de suelos activados electrobioquímico



**Tabla 23.** Identificación a nivel de género de todas las secuencias de la operación en lote del reactor de suelos activado electrobioquímico (se presentan solo las abundancias de género superiores al 1% y todas las otras secuencias se incluyen en “otros”)

<b>Genero/Tiempo (Días)</b>	<b>In SR</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>30</b>
<i>Actinobacteria Acidimicrobiia Acidimicrobiales</i>	1	0.8	1.4	2.2	0.3	1.4
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales</i>	2	4.8	2.8	2.1	6.7	2.3
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales Bacteroidaceae Bacteroides</i>	3.4	2.1	5.1	5.1	3.6	4.1
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales Prevotellaceae Prevotella</i>	4.7	3.2	9.1	8.3	5.9	8.3
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales SB-1</i>	0.5	0.5	0.6	0.3	2.7	0.2
<i>Firmicutes Bacilli Lactobacillales Carnobacteriaceae Trichococcus</i>	10.2	8.5	3	7	4.6	8.1
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales</i>	2.9	1.4	2.2	2.1	1.9	2.2
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Clostridiaceae Clostridium</i>	3.3	3.8	2.3	3.4	2.7	2.1
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Clostridiaceae Proteiniclasticum</i>	1.4	9.2	0.7	1	0.2	4
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae</i>	16.8	3.1	5.4	5.7	4.9	5.5
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Ruminococcaceae</i>	2.6	1.6	3	2.8	2.4	2.9
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Ruminococcaceae Faecalibacterium</i>	6.1	2.5	5.3	4.5	3.5	4.1
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales [Tissierellaceae] Tissierella_Soehngenia</i>	2.9	1.5	1.3	1.8	0.9	1.5
<i>Proteobacteria Alphaproteobacteria Rhodobacterales Rhodobacteraceae</i>	0.1	0.2	6.4	0.3	0.2	0.2
<i>Proteobacteria Deltaproteobacteria Desulfobacterales Desulfobacteraceae Desulfococcus</i>	1.1	1.4	0.7	0.8	2	1.1
<i>Proteobacteria Epsilonproteobacteria Campylobacterales Helicobacteraceae</i>	0.4	1.9	0.5	0.7	2.4	1.6
<i>Proteobacteria Epsilonproteobacteria Campylobacterales Helicobacteraceae Sulfuricurvum</i>	0	0	0.2	0	3.3	0
<i>Proteobacteria Epsilonproteobacteria Campylobacterales Helicobacteraceae Sulfurimonas</i>	0.1	0.4	3.6	0.3	1.3	0.1
<i>Proteobacteria Gammaproteobacteria Aeromonadales Succinivibrionaceae Succinivibrio</i>	0.1	0.5	0.7	0.9	1	2.1
<i>Proteobacteria Gammaproteobacteria Pseudomonadales Moraxellaceae Acinetobacter</i>	0	2.2	0.1	0.1	0	3.1
<i>Proteobacteria Gammaproteobacteria Pseudomonadales Pseudomonadaceae Pseudomonas</i>	0	1.9	2.5	0.6	0.5	1.4
<i>Synergistetes Synergistia Synergistales Thermovirgaceae</i>	9	6.6	1.5	2.9	6.8	3
<i>Thermotogae Thermotogales Thermotogaceae Kosmotoga</i>	0.2	2.7	1.1	0.6	4.4	0.9
Otros	31.2	39.2	40.5	46.5	37.8	39.8



### 6.3.3 3<sup>er</sup> Experimento (Suelo, 33%, Tween 80)

#### 6.3.3.1 Ensayo de desorción con Tween 80

En la Figura 19 se muestra el lindano desorbido por Tween 80 del suelo contaminado, se observa que no hay un efecto positivo significativo en la desorción de lindano del suelo usando diferentes concentraciones. Cuando la concentración de Tween 80 es de 2000 mg/L (333 CMC) aproximadamente se logra un 9% de desorción de lindano del suelo.

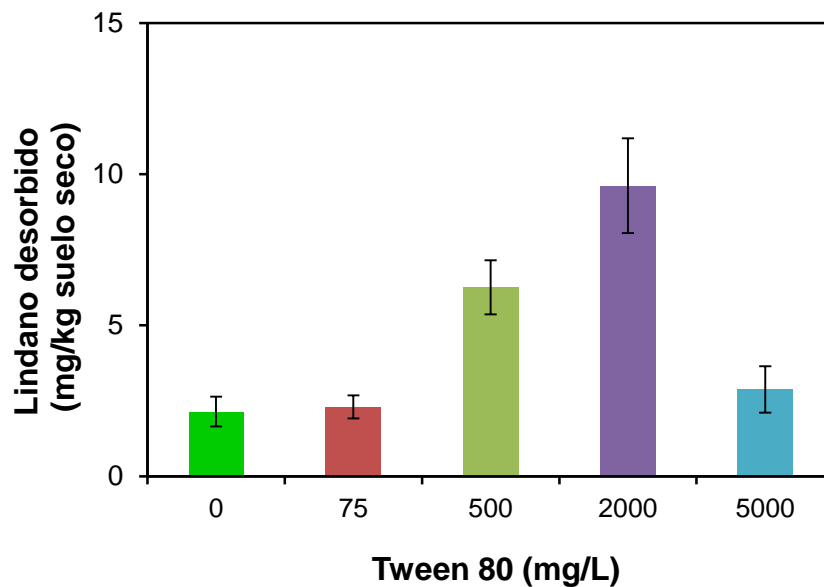


Figura 19. Ensayo extractivo con Tween 80



### 6.3.3.2 Determinación de la resistencia interna

Al inicio de la operación del RSA EBQ se operó a circuito abierto con la finalidad que el sistema se estableciera, posteriormente el ánodo se conectó con el cátodo a través de una resistencia externa variable (100- 1M $\Omega$ ) con el objetivo de estimar el valor de la resistencia interna del RSA EBQ (Logan *et al.*, 2006). La resistencia interna del RSA EBQ es una de las características esenciales, ya que de acuerdo con el Teorema de Jacobi de la máxima potencia generada por una FEM, un RSA EBQ operado bajo una resistencia externa igual a su resistencia interna dará la potencia máxima (Halliday *et al.*, 2005).

Bajo esta consideración, se llevó a cabo la curva de polarización del RSA EBQ, esto es, el voltaje de la celda y la intensidad de corriente en función de un valor de resistencia externa.

El voltaje se midió a través de un multímetro convertido posteriormente a corriente y densidad de potencia aplicando la Ley de Ohm. En la Tabla 23 se observan las resistencias internas determinadas en tiempo 0d y 7d.

Los valores obtenidos a partir de la curva de polarización fueron 5560, 6022, 12419, 3845  $\Omega$  para cara A, cara B, conexión en serie y conexión en paralelo respectivamente (Tabla 23). La potencia volumétrica máxima fue obtenida cuando las conexiones fueron en paralelo (60.55 mW m<sup>-3</sup>), seguida por conexión en serie, cara A, y cara B con 38, 11.86, 10.72 mW m<sup>-3</sup> respectivamente.

Después de 7 días de operación, se llevó a cabo de nuevo la caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico. La resistencia de interna disminuyó comparado con la primera caracterización. Los valores fueron aproximadamente de 4652, 3867, 1041, 804 $\Omega$  para cara A, cara B, conexión en serie y conexión en paralelo respectivamente (Tabla 23).

La potencia volumétrica máxima fue obtenida para la conexión en paralelo (373.57 mW m<sup>-3</sup>, Tabla 23), la potencia fue alrededor de 5 veces más alto que en la caracterización del día 0. El mejoramiento de la caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico puede ser debido al incremento de la actividad microbiana debido al resultado del enriquecimiento de la biopelícula en el ánodo (Lu *et al.*, 2009).



**Tabla 24.** Valores de diversas variables de la caracterización del reactor de suelos activados electrobioquímico

Parámetro	Cara A		Cara B		Serie		Paralelo	
	0	7	0	7	0	7	0	7
$R_{int}$ ( $\Omega$ )	5660	4652	6022	3867	12419	1041	3845	804
$P_{An-max}$ ( $mWm^{-2}$ )	0.94	12.33	0.86	8.01	3.04	29.58	4.84	29.90
$P_{V-max}$ ( $mWm^{-3}$ )	11.86	154.14	10.72	100.18	38.08	369.61	60.55	373.57
$I_{EBQ-max}$ (mA)	0.11	0.67	0.08	0.55	0.07	0.72	0.11	0.93
$E_{EBQ-max}$ (V)	0.31	0.57	0.32	0.58	0.50	0.60	0.54	0.59
$P_{EBQ-max}$ (mW)	0.004	0.05	0.01	0.03	0.01	0.11	0.02	0.11
$P_{An-prom}$ ( $mWm^{-2}$ )	0.37	4.54	0.39	3.93	1.04	9.99	1.72	9.92
$P_{V-prom}$ ( $mWm^{-3}$ )	4.57	56.82	4.86	49.20	13.01	124.79	21.46	123.97
$I_{EBQ-prom}$ (mA)	0.02	0.11	0.02	0.09	0.03	0.18	0.05	0.18
$E_{EBQ-prom}$ (V)	0.13	0.30	0.13	0.31	0.21	0.38	0.25	0.39
$P_{EBQ-prom}$ (mW)	0.001	0.18	0.001	0.015	0.004	0.03	0.007	0.04

**Notas:**  $R_{int}$ : resistencia interna;  $P_{An}$ : densidad de potencia anódica;  $P_V$ : potencia volumétrica;  $E_{EBQ}$ : Voltaje;  $I_{EBQ}$ : intensidad de corriente;  $P_{EBQ}$ : potencia; Sub-índices: max: máximo; prom: promedio.



La resistencia interna fue más pequeña que el valor de 10 k $\Omega$  obtenido por Ringerlberg *et al.* (2011), ellos trabajaron con un cilindro (2.2 cm x 10 cm, D x h) como reactor, el suelo utilizado fue suelo franco limoso con 11% de materia orgánica, el ánodo fue tela de carbón (16 cm<sup>2</sup> de superficie) y el cátodo fue tela de carbón recubierta de un lado con 0.5 mg Pt cm<sup>-2</sup>. Por otro lado Wang *et al.* (2011) reportaron valores de 1000 $\Omega$ . Wang *et al.* (2011) trabajaron con una de tubo en forma de U, el ánodo y el cátodo fueron de malla de carbón y fueron conectados en paralelo. El cátodo fue recubierto con 0.1mg cm<sup>-2</sup> Pt.

### **6.3.3.3 Desempeño del reactor de suelos activados electrobioquímico**

El RSA EBQ fue operado en lote a temperatura ambiente. Primero se midió el voltaje a circuito abierto durante 11 h, el voltaje promedio fue de 666 mV (Figura 20). Después se procedió a cerrar el circuito del reactor con la resistencia externa determinada en la sección 6.1.1 y conectada en paralelo. Al conectarse la resistencia externa (3300 $\Omega$ ) el voltaje disminuyó, con un valor promedio de 245 mV. Posteriormente se procedió a determinar la resistencia interna del RSA EBQ y se obtuvo que la resistencia interna fue de 820 $\Omega$ , el voltaje promedio fue de 420 mV, con una potencia volumétrica promedio de 742 mW m<sup>-3</sup>.

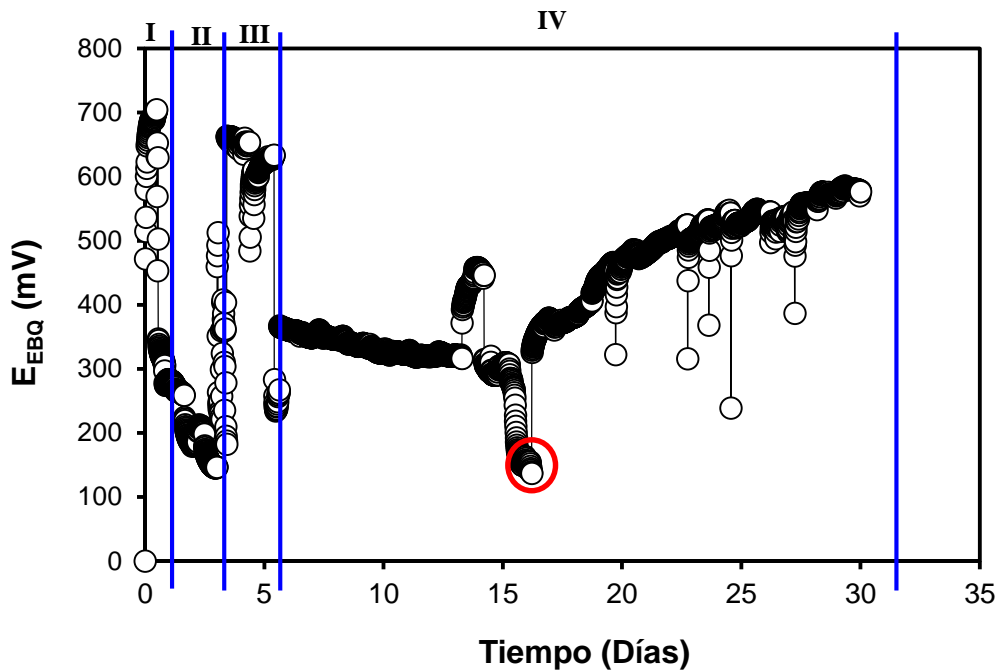
La Tabla 24 muestra los máximos y el promedio de las variables de parámetros del reactor de suelos activados electrobioquímico operado en lote durante 30 días.

El voltaje máximo del RSA EBQ (585 mV) y la potencia máxima (108 mW m<sup>-2</sup>) fueron más altos que lo reportado por Wang *et al.* (2011) (155 mV y potencia máxima 0.85 mW m<sup>-2</sup>) trabajaron con una celda con suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo. Nuestros resultados son comparados muy favorablemente con lo reportado por Yan *et al.* (2012), donde obtuvieron un voltaje muy bajo de 17 mV, en el tratamiento de un sedimento contaminado con fenantreno y pireno. Por otro lado Huang *et al.* (2011) registraron una densidad de potencia de 30 mW m<sup>-2</sup> y voltaje bajo de 150 mV en el tratamiento de un suelo contaminado con fenol.

**Tabla 25.** Parámetros evaluados en la operación del reactor de suelos activados electrobioquímico

Parámetro	
$P_{An-max}$ ( $mWm^{-2}$ )	108
$P_{V-max}$ ( $mWm^{-3}$ )	1357
EBQ-max (V)	0.58
$I_{EBQ-max}$ (mA)	0.71
$P_{EBQ-max}$ (mW)	0.42
$P_{An-prom}$ ( $mWm^{-2}$ )	$54 \pm 30$
$P_{V-prom}$ ( $mWm^{-3}$ )	$685 \pm 377$
$E_{EBQ-prom}$ (V)	$0.42 \pm 0.12$
$I_{EBQ-prom}$ (mA)	$0.47 \pm 0.17$
$P_{EBQ-prom}$ (mW)	$0.21 \pm 0.11$

**Notas:** P<sub>An</sub>: densidad de potencia anódica; P<sub>V</sub>: potencia volumétrica; E<sub>EBQ</sub>: Voltaje; I<sub>EBQ</sub>: intensidad de corriente; P<sub>EBQ</sub>: potencia; Sub-índices: max: máximo; prom: promedio



**Figura 20.** Dinámica de operación del reactor de suelos activados en lote durante 30 días de operación. La adición de sustrato es indicada por el círculo rojo. Fase I, circuito abierto; fase II, circuito cerrado con resistencia externa de  $3300\Omega$ ; fase III, circuito abierto; fase IV, circuito cerrado con resistencia externa de  $820\Omega$ .



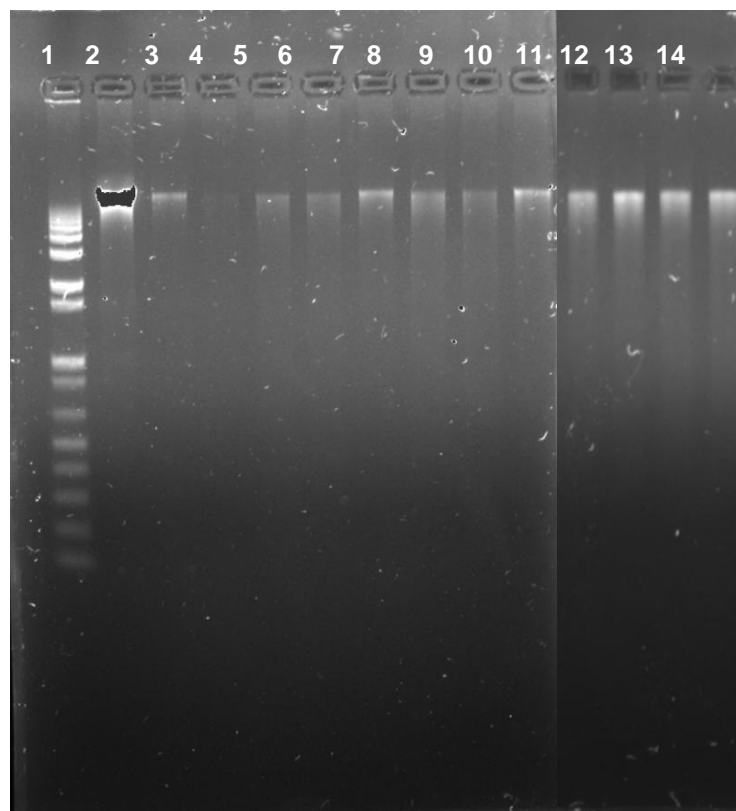
#### **6.3.3.4 Determinación de lindano**

Durante la operación en lote, el RSA EBQ mostró 56% de remoción de lindano y en el control biótico la remoción fue de 72%. Inesperadamente la  $\eta$ lindano fue más baja que en el RSA EBQ operado sin tensoactivo. Esto puede ser adscrito a la influencia del incremento de la materia orgánica degradable suministrada en el experimento. En efecto, fueron cuatro fuentes de materia orgánica degradable: materia orgánica soluble en el suelo, dos pulso de la mezcla de sacarosa: acetato de sodio: lactato y Tween 80, el cual ha sido demostrado que ha sido usado con fuente de carbono y energía por una variedad de cultivos mixtos. Un exceso de materia orgánica disponible podría haber afectado el consumo de lindano por la comunidad microbiana.

## 6.4 Caracterización microbiana del reactor de suelos activados electrobioquímico por DGGE

### 6.4.1 Extracción total de DNA

A continuación se muestran los resultados del seguimiento de las comunidades microbianas del reactor de suelos activados electrobioquímico (Inoculo sulfato reductor y Tween 80, 3<sup>er</sup> Experimento). En la Figura 21 se muestra el gel de agarosa en donde se analizó la extracción de los ácidos nucleicos, en la Tabla 25 se muestra la concentración y pureza del DNA extraído.



**Figura 21.** Extracción de DNA (Gel de agarosa al 1%)



**Tabla 26.** Concentración y pureza del DNA extraído de las muestras provenientes del RSA EBQ

Carril	Muestra	Concentración (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
1	Marcador (1Kb)	NA	NA	NA
2	<i>E. Coli</i> SK0019	191.4	3.827	1.83
3	RISR t <sub>0</sub>	11.2	0.223	1.78
4	NMP t <sub>0</sub>	2.9	0.059	1.45
5	RSA EBQ t <sub>0</sub>	18.9	0.378	1.50
6	Control t <sub>0</sub>	12.6	0.252	1.51
7	RISR t <sub>15</sub>	10.4	0.208	1.76
8	Alimentación	19.9	0.399	1.52
9	RSA EBQ t <sub>15</sub>	16.1	0.322	1.60
10	Control t <sub>15</sub>	14.1	0.282	1.76
11	RSA EBQ t <sub>22</sub> Valto	22.6	0.452	1.65
12	Control t <sub>22</sub> Valto	19.3	0.386	1.74
13	RSA EBQ t <sub>30</sub>	23.4	0.469	1.60
14	Control t <sub>30</sub>	24.3	0.486	1.69

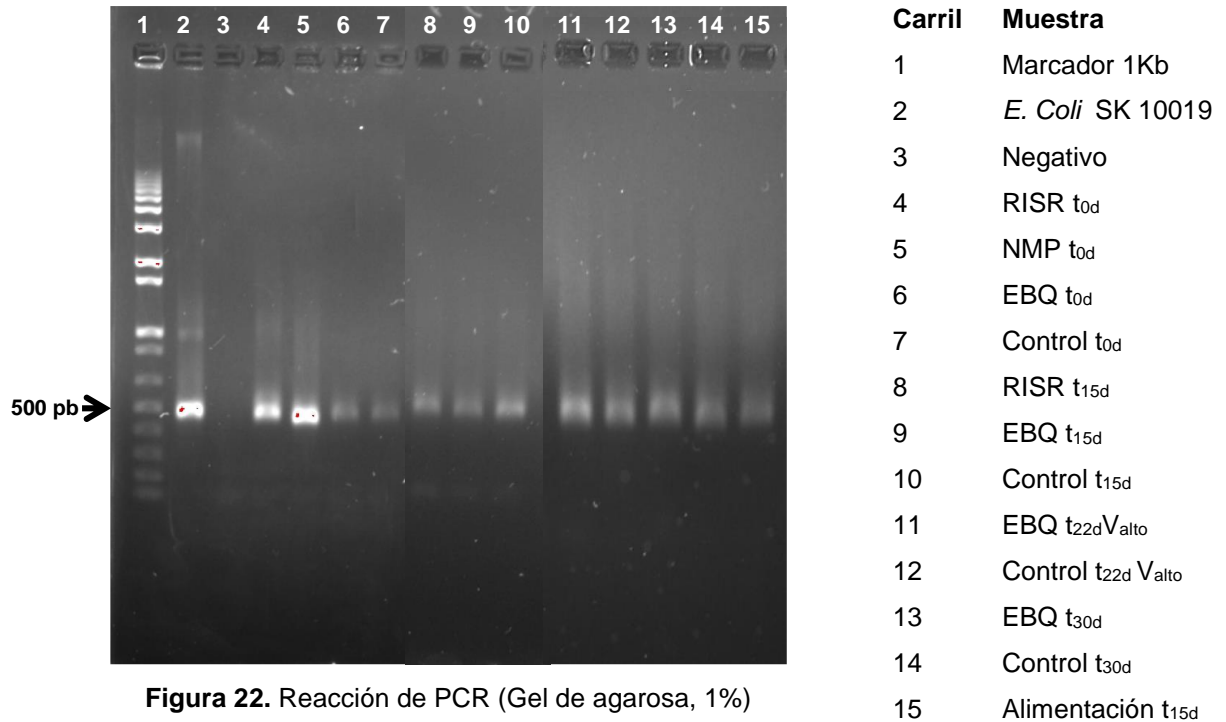
**Notas:** NA; No aplica, RSA EBQ; Reactor de suelos activados electrobioquímico, V<sub>alto</sub>; Voltaje alto

#### 6.4.2 Amplificación de la región 16s rDNA

Una vez confirmada la calidad de DNA se amplificó por PCR un fragmento de 505 pb correspondiente a la sección intermedia de 16S rDNA (regiones V3 y V4) usando los oligos CGO 465F con pinza de GC y CGO 465R. En la Figura 22 se la reacción de PCR.

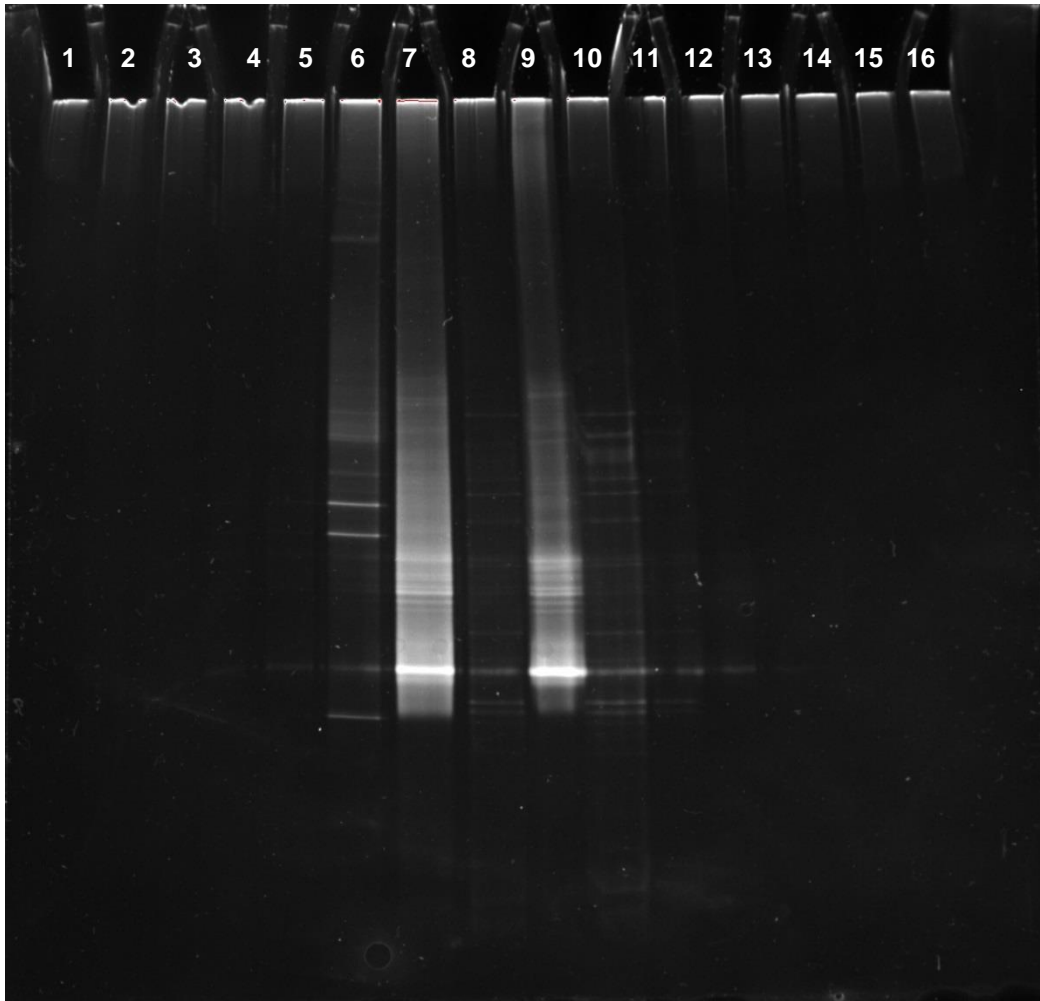
#### 6.4.3 Fraccionamiento electroforético en gel con gradiente desnaturante (DGGE) de amplicones obtenidos por PCR.

Se realizó el fraccionamiento de los productos PCR por DGGE (estandarización de DGGE), para evaluar el porcentaje de desnaturación (25-70%) y concentración de la muestra por carril, en la Figura 23 se muestra el gel de DGGE, con lo observado se decidió trabajar con 20 μg de producto de PCR para cada carril.



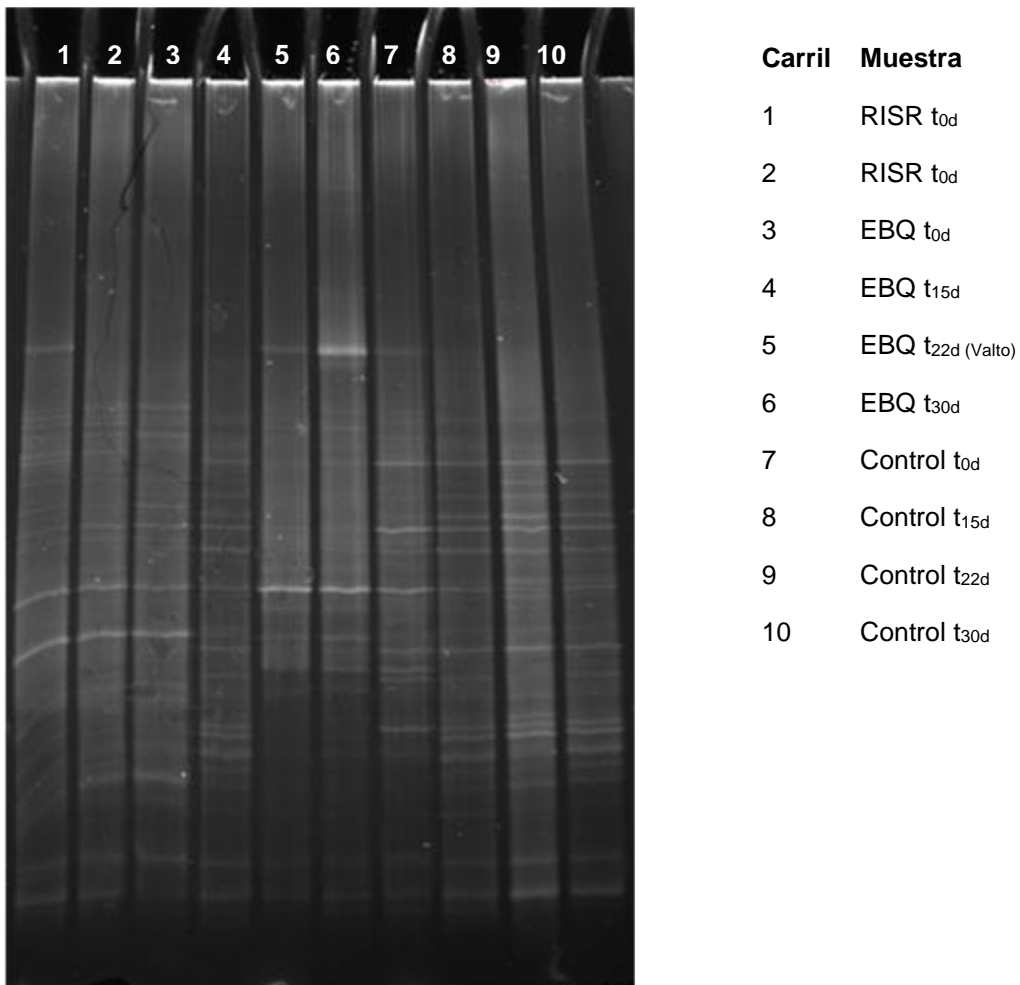
**Figura 22.** Reacción de PCR (Gel de agarosa, 1%)

En la Figura 24 podemos observar el fraccionamiento del producto de PCR de las diferentes muestras de la cinética. Las muestras provenientes del reactor inoculador sulfato reductor las podemos observar en el carril 1 y 2, tiempo 0d y 15d respectivamente. Las muestras del reactor electrobioquímico se observan en los carriles 3-6, que son los tiempos de muestreo de la cinética de remoción de lindano y producción de energía eléctrica. En el carril 5, podemos observar la muestra proveniente del reactor electrobioquímico a 22 días de operación, en donde se observó el voltaje alto (0.58V), podemos percatar que en dicho carril una de las bandas se observa más intensa, podemos hipotetizar que es debido a la presencia de bacterias productoras de electricidad.



**Figura 23.** Gel de DGGE, 25-70%. C1-5: Buffer 2X; C6:A1309 (13 $\mu$ g); C7:*E.Coli* SK 10019 (22  $\mu$ g); C8:EBQ (19  $\mu$ g); C9:*E.Coli* SK 10019 (24  $\mu$ g);C10:EBQ (18 $\mu$ g); C11:RISR (3.5  $\mu$ g); C12-16:Vacío.





**Figura 24.** Monitoreo microbiano de la operación del reactor de suelos activados electrobioquímico en gel DGGE 25-70%.

#### **6.4.4 Análisis de los índices de similitud por presencia /ausencia de bandas**

Con la ayuda del análisis de bandas, se realizó el cálculo del coeficiente de similitud, índice de Jaccard (Ecuación 4). Este índice presenta valores entre 1 y 0, donde 1 es la mayor similitud entre carriles y 0 indica la falta de similitud. El índice de Jaccard o coeficiente de similitud de Jaccard es una herramienta estadística utilizada para determinar similitud entre poblaciones, y puede ser definida como la intersección de dos muestras dividida entre el tamaño de la unión de las mismas; es decir, toma en cuenta la cantidad de organismos



similares en dos poblaciones (intersección) y lo relaciona con respecto al número total de individuos distintos de ambas poblaciones (unión).

$$IJ = \frac{n_{AB}}{(n_A + n_B - n_{AB})} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde

$n_{AB}$ : Número de bandas en común en los carriles A y B

$n_A$ : Número de bandas totales en el carril A

$n_B$ : Número de bandas totales en el carril B

El coeficiente de divergencia, índice de divergencia de Poggi (Ecuación 5) tiene valores de 1 a 0, donde 1 indica divergencia total y 0 indica no divergencia.

$$\Delta_{Poggi} = \frac{(n'_A + n'_B)}{n_A + n_B} \quad \text{Ecuación 5}$$

Se realizó el conteo de bandas en el gel de DGGE (carriles 3,4,5,6) para la cinética de remoción de lindano y producción simultánea de energía en el reactor electrobioquímico. Se evaluó las bandas que aparecen y desaparecen con respecto al tiempo de operación del reactor electrobioquímico (Tabla 26). Posteriormente se realizaron los índices de similitud y divergencia (Tabla 27 y 28).



**Tabla 27.** Número de bandas de bacterias vs tiempo en la operación del reactor de suelos activados electrobioquímico

Tiempo (Días)	Bandas totales	Bandas que aparecen	Bandas que desaparecen
0	24		
15	24	4	4
22	24	3	3
30	15	4	13

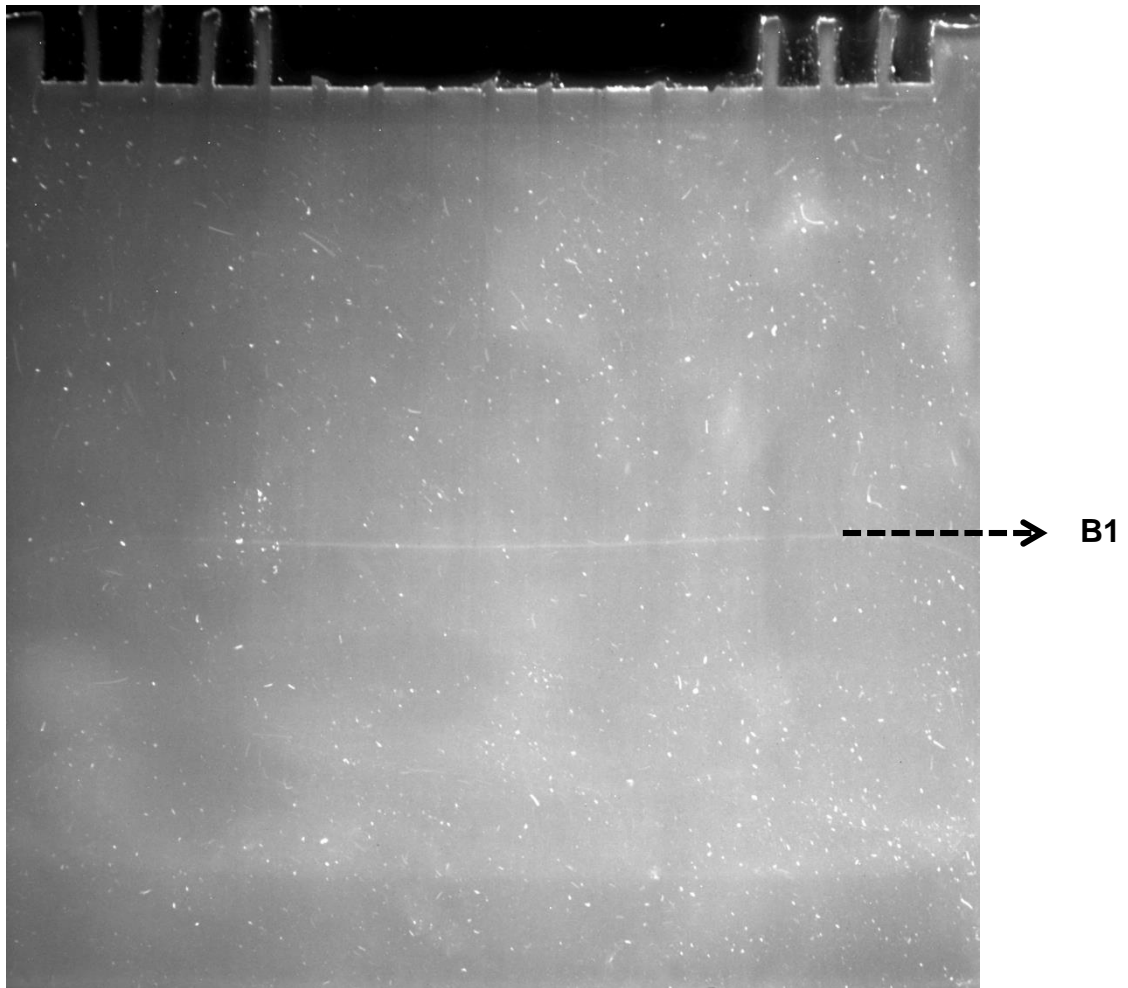
**Tabla 28.** Índice de similitud de Jaccard, en las muestras del reactor de suelos activados electrobioquímico

$I_{\text{JACCARD}}$	15 días	22 días	30 días
0 día	0.71	0.77	0.39
15 días		0.71	0.5
22 días			0.44

**Tabla 29.** Índice de divergencia de Poggi, en las muestras del RSA EBQ

$\Delta_{\text{POGGI}}$	15 días	22 días	30 días
0 día	0.16	0.12	0.43
15 días		0.16	0.33
22 días			0.38

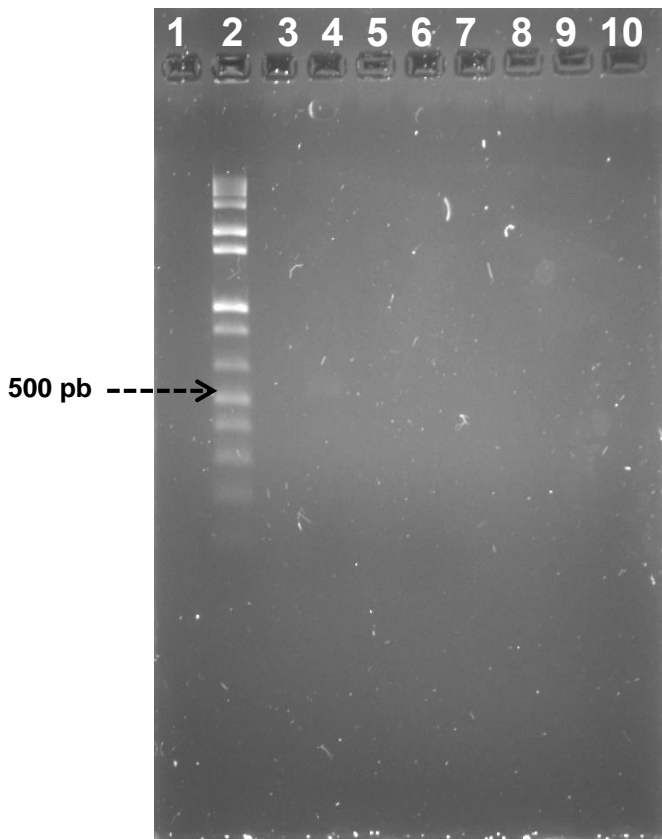
Se elaboró el gel de DGGE preparativo (Gradiente de desnaturalización: 25-70%, un solo pozo) con la muestra tomada el día que el voltaje fue alto (22 días de operación), se decidió trabajar con esta muestra debido a que la primera banda se observó intensa e hipotetizamos que era debido a la comunidad microbiana capaz de producir energía eléctrica. Se cortó 1 banda (Figura 25).



**Figura 25.** Gel de DGGE preparativo, muestra RSA EBQ a 22 días de operación

#### 6.4.5 Recuperación del DNA fraccionado en gel de poliacrilamida por el método de electroelución

Se recuperó el DNA de la banda por el método de electroelución descrito en la metodología. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa 1.5% para confirmar la extracción del DNA de la banda cortada (Figura 26), simultáneamente se realizó la lectura de absorbancia del extracto de DNA, la concentración de DNA de la banda cortada fue de 31.8 ng/ $\mu$ l.

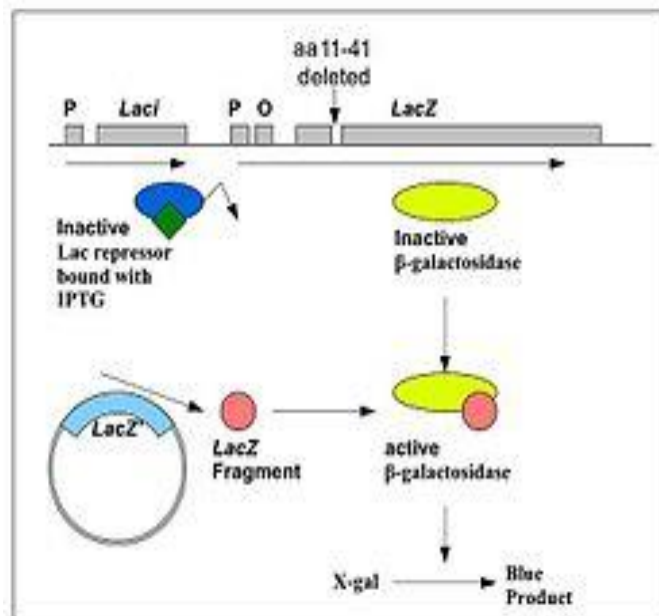


**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) del DNA extraído de la banda de DGGE.

Nota: Carril 1: vacío, 2: marcador invitrogen 1Kb plus, 2: vacío, 3: Banda 1(31.8 ng/ $\mu$ l).

Se llevó a cabo la ligación del producto de PCR de la banda 1 en el vector PCR<sup>TM</sup> 2.1-TOPO como se explicó anteriormente. Posteriormente se realizó la transformación. Se espatuló 50  $\mu$ l de las células transformadas en placas de LB con Kanamicina, X-gal e IPTG. Se dejaron crecer las colonias a 37°C toda la noche. Para las bacterias transformadas con el producto de PCR de la banda 1, se obtuvieron 3 colonias blancas, 3 colonias de color azul claro y 1 colonia de azul fuerte. Para el producto de PCR control del kit se obtuvieron 279 colonias blancas y 9 colonias azul fuerte. Las colonias blancas indican que el producto de

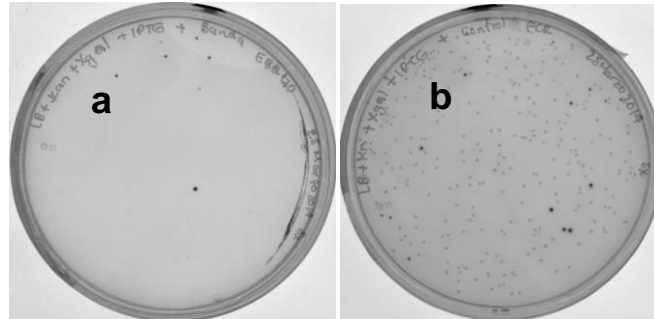
PCR fue ligado en el vector. Esto se explica de la siguiente manera: la molécula de IPTG es absorbida por la bacteria a través de la acción de la enzima permeasa de lactosa. Una vez dentro de la célula, induce la transcripción del gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa, una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -galactósidos a monosacáridos. En experimentos de clonación, las colonias bacterianas que han sido transformadas con un plásmido recombinante se pueden identificar usando un análogo de galactosa, el 5-bromo-4-cloro-3 indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (abreviado X-gal). Este compuesto puede ser metabolizado por la  $\beta$ -galactosidasa en galactosa, un monosacárido y 5-bromo-4-cloro-3 hidroxinol, un compuesto de color azul. Las células transformantes que han captado plásmidos con el operón lac intacto, una vez inducidas por IPTG, están expresando activamente  $\beta$ -galactosidasa, que hidroliza X-gal y colorea de azul las colonias. Las colonias de células transformantes que han captado un plásmido con el operón lac recombinante, en cuyo interior ha sido insertado el producto de PCR (en este caso), sufren con la inserción la inactivación del gen lac z (gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa) y por tanto, no puede expresar la  $\beta$ -galactosidasa ni degradar X-gal, permaneciendo las colonias de color blanco (Figura 27).



**Figura 27.** Representación esquemática de la selección de bacterias azul- blanca en vectores recombinantes



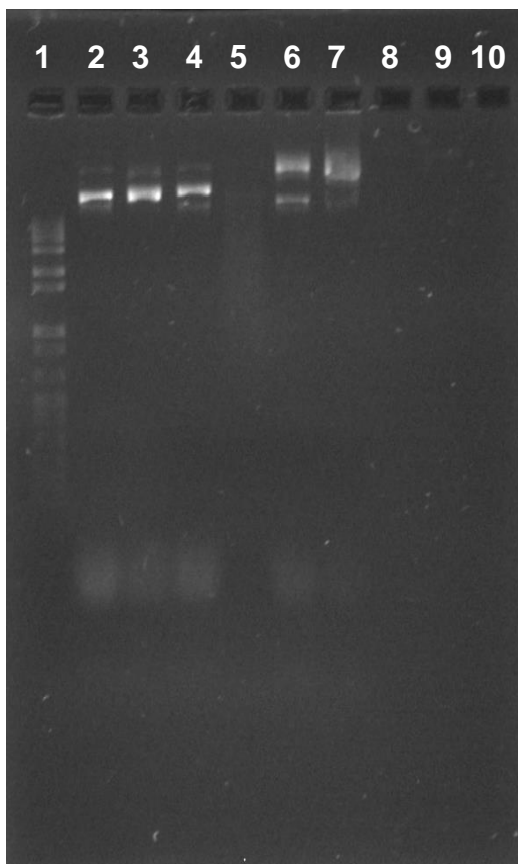
De la placa de post-transformante (Figura 28) se seleccionaron 5 colonias que después de sembrarse por estría simple en cajas de LB con kanamicina (50µg/mL) se crecieron en medio líquido para extracción de plásmido por método de lisis alcalina.



**Figura 28.** Plaqueo de post-transformantes resultantes de la clonación del fragmento de 16S recuperado de DGGE, (a) Post-transformantes de clonación de banda 1, (b) control (+) de ligación.

#### 6.4.6 Extracción de plásmido por lisis alcalina

En la Figura 29 se observan los plásmidos extraídos por lisis alcalina de las post-transformantes.



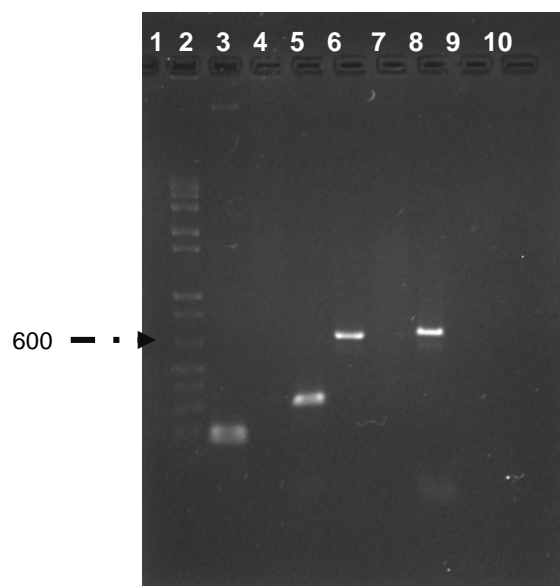
**Figura 29.** Plásmidos obtenidos de las clonas obtenidas de la banda 1, fragmento de 16s rDNA recuperado del gel de DGGE

**Tabla 30.** Cuantificación del DNA plasmídico

Carril	Muestra	Concentración (ng/μl)	A <sub>260</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
1	Marcador 1Kb	NA	NA	NA
2	Clona 1	2016.6	40.332	2.03
3	Clona 2	1935.3	38.705	2.01
4	Clona 3	1627.5	32.550	1.99
5	Clona 4	11.7	0.234	1.90
6	Clona 5	1942.2	38.844	2.03
7	Control positivo	1811.1	36.222	2.00

#### 6.4.7 Confirmación por PCR del inserto en el vector PCR™ 2.1-TOPO

Se realizó la reacción de confirmación del inserto por PCR. En la Figura 30 se observa que únicamente se logró la inserción del fragmento correspondiente en la clona 3 y clona 5, debido a que el producto esperado es de 697 pb.



**Figura 30.** Amplificación por PCR para la confirmación de la inserción del fragmento de 16S rDNA en el vector PCR™ 2.1-TOPO. Nota: gel de agarosa 1.5%, teñido con AMD-1000; carril 1: vacío; carril 2: Marcador Invitrogen PLUS 1Kb, carril 3: control positivo, carril 4: clona 1; carril 5: clona 2; carril 6: clona 3; carril 7: clona 4; carril 8: clona 5; carriles 9-10 vacío.





#### 6.4.8 Análisis de los electroferogramas y asignación de filogenia

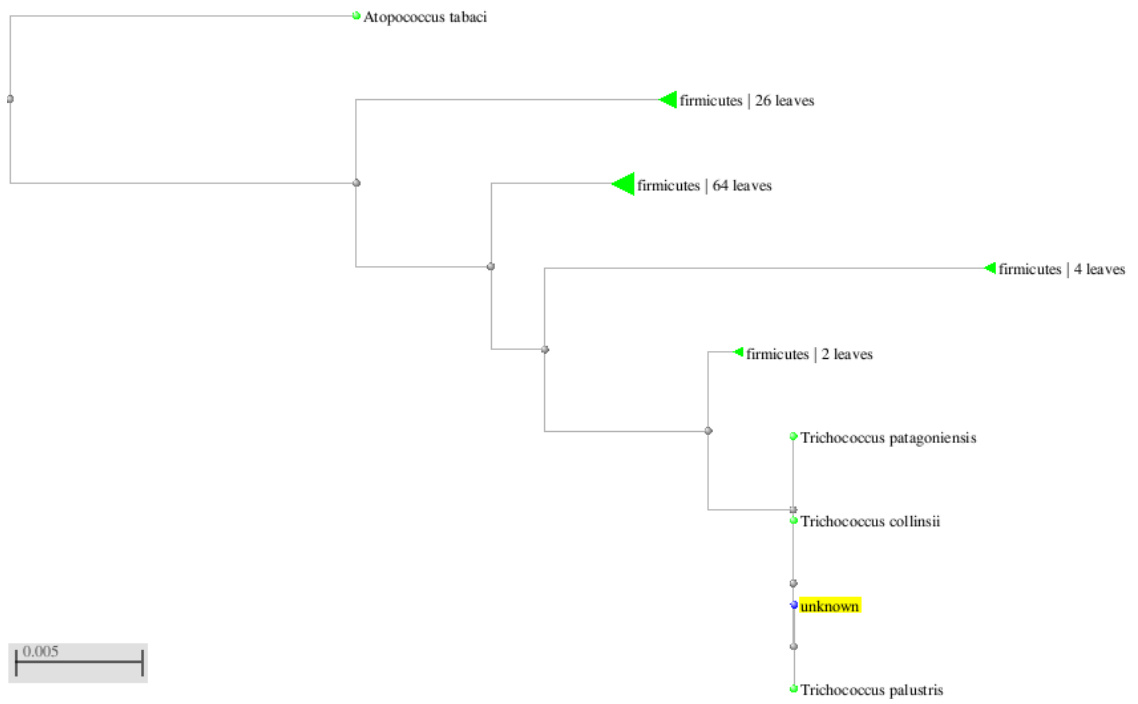
Únicamente se pudo obtener la secuencia del plásmido proveniente de la banda 1 clona 3. Las secuencias se visualizaron en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9.0 y posteriormente fueron depuradas con el programa Vector NTI suite 11. Las moléculas fueron comparadas con la base de datos de secuencias reportadas para el gen 16s rDNA bacteriano utilizando la herramienta BLAST (NCBI) y de cuyo resultado se tomaron las secuencias de las 10 especies que mostraron un índice máximo de identidad mayor a 90% y nivel de expectación (E-value) más cercano a cero (Tabla 30). Podemos observar en el árbol filogenético (Figura 31) que la banda 1 muestra una similitud de 99% y un E-value de 0 con el género *Trichococcus*. Esta bacteria pertenece al filo: firmicutes, clase: bacilli, orden lactobacillales, familia carnobacteriaceae. Zaybak *et al.* (2013) desarrollaron un método de pre-enriquecimiento para mejorar el desempeño de biocátodos anaerobios facultativos autótrofos capaces de usar cátodos como donador de electrones y como aceptor de electrones CO<sub>2</sub>. La muestra de bacterias anaerobias provenían de un sedimento, el enriquecimiento fue primero realizado en un cultivo en lote alimentado con glucosa y después se usó como inóculo en un biocátodo en un sistema bioelectroquímico (BESs) en la cámara catódica, se aplicó un voltaje de -0.4V. Después de 2 semanas de operación heterotrófica en el BESs, el CO<sub>2</sub> fue previsto como la única fuente de aceptor de electrones y fuente de carbono. El consumo de electrones en el cátodo incremento gradualmente y se mantuvo alrededor de 2 meses, relacionado con una disminución de CO<sub>2</sub> en el espacio gaseoso de la cámara catódica. La densidad de corriente máxima consumida fue de  $-34 \pm 4$  mA/m<sup>2</sup>. La biosíntesis dio como resultado compuestos orgánicos: butanol, etanol, acetato, propionato, butirato e hidrogeno gaseoso. La comunidad bacteriana basada en análisis del 16S rDNA revelaron *Trichococcus palustris* DSM 9172 (99% de identidad) como la especie prevalente en la comunidad del biocátodo. Por otro lado Stams *et al.* (2009) estudiaron el tratamiento de aguas residuales para la remoción de sulfato, como fuente de carbono usaron citrato. El citrato no es un donador directo de electrones para las bacterias sulfato reductoras, sin embargo, el citrato fue fermentado principalmente en acetato y formato. Estos productos de fermentación sirvieron como donadores de electrones para las bacterias sulfato reductoras. En este proceso se identificaron



dos bacterias que fueron identificadas como *Trichococcus pasteuris* y *Veillonella montepellierensis*.

**Tabla 31.** Tabla de identidad utilizando la herramienta BLAST

Descripción	Índice máximo de identidad (%)	Nivel de expectación (E-value)
<i>Trichococcus patagoniensis</i> strain PmagG1	99	0.0
<i>Trichococcus collinsii</i> strain 37AN3	99	0.0
<i>Trichococcus palustris</i> strain DSM 9172	99	0.0
<i>Trichococcus pasteurii</i> strain KoTa2	99	0.0
<i>Trichococcus flocculiformis</i> strain DSM 2094	99	0.0
<i>Isobaculum melis</i> strain M577-94	97	0.0
<i>Enterococcus termitis</i> strain LMG 8895	97	0.0
<i>Vagococcus lutrae</i> strain m1134/97/1	97	0.0
<i>Vagococcus fluvialis</i> strain M-29c	97	0.0



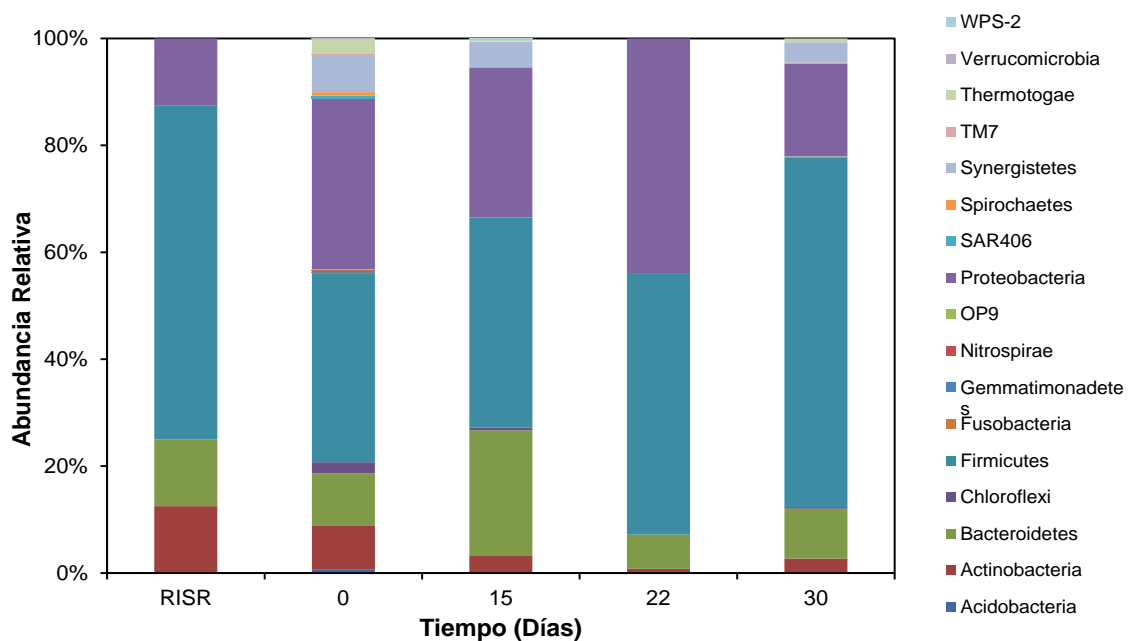
**Figura 31.** Árbol filogenético para la secuencia de la banda 1 proveniente de la muestra del reactor de suelos activado electrobioquímico a 30 días de operación

### 6.4.9 Caracterización del consorcio microbiano usando el equipo Ion Torrent (PGM)

La Figura 32 muestra la composición de la población bacteriana obtenida del inoculo sulfato-reductor y del reactor de suelos activados a diferentes días de operación. Los fila más representativos fueron Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Synergistetes.

Kim *et al.* (2013) realizaron un análisis filogenético de las muestras microbianas, el análisis reveló una comunidad bacteriana diversa que consistió de Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Espiroquetas. Los autores trabajaron con una celda de combustible microbiana con el cátodo aireado, ensamble membrana-electrodo combinado en reactores tubulares. La celda microbiana fue inoculada con lodos de un digestor anaeróbico.

En nuestro trabajo, los géneros más dominantes pertenecen a *Arcobacter*, 40.8%, and *Trichococcus* (41.6%) a 22 días de operación (Tabla 32), cuando el reactor de suelos activados electrobioquímico exhibió el mayor voltaje. *Arcobacter* fue reportado en electrodos de celdas de combustible microbianas, generan un fuerte potencial electronegativo, cuando es suplido con acetato (Fedorovich *et al.*, 2009). *Trichococcus* ha sido reportado en sistemas bioelectroquímicos en biocátodo autotróficos (Zaybak *et al.*, 2013).



**Figura 32.** Identificación a nivel filo de la comunidad microbiana en el reactor inoculador sulfato reductor y en el reactor de suelos activados electrobioquímico



**Tabla 32.** Identificación a nivel de género de todas las secuencias de la operación en lote del reactor de suelos activados electrobioquímico (se presentan las abundancias de género superiores al 1%, las otras secuencias se incluyen en “otros”)

Genero/Tiempo (Días)	In SR	0	15	22	30
<i>Actinobacteria Acidimicrobiia Acidimicrobiales</i>	0	1.3	0.6	0.2	0.3
<i>Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Actinomycetaceae __N09</i>	0	1.2	0.6	0.2	0.9
<i>Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Nocardioidaceae Propionicimonas</i>	6.2	0	0.1	0	0.1
<i>Actinobacteria Actinobacteria Actinomycetales Propionibacteriaceae</i>	6.2	0.2	0	0	0.2
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales</i>	0	4.2	17.6	0.3	1.7
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales Porphyromonadaceae</i>	0	0.9	3.5	5.4	4.9
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales Prevotellaceae Prevotella</i>	6.2	2.1	0.4	0	0.8
<i>Bacteroidetes Bacteroidia Bacteroidales Rikenellaceae Blvii28</i>	6.2	0.1	0.5	0	0
<i>Firmicutes Bacilli Bacillales Bacillaceae Bacillus</i>	6.2	2	1.9	0.6	0.8
<i>Firmicutes Bacilli Lactobacillales Carnobacteriaceae Trichococcus</i>	6.2	1.9	7.4	41.6	45
<i>Firmicutes Bacilli Lactobacillales Lactobacillaceae Lactobacillus</i>	0	1.6	0	0	0.5
<i>Firmicutes Bacilli Lactobacillales Streptococcaceae Lactococcus</i>	6.2	0.2	0	0	0.1
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales</i>	12.5	0.8	3.2	0.3	1.4
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Clostridiaceae</i>	0	1.3	0.6	0.6	1
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Clostridiaceae Clostridium</i>	0	8.8	3.9	1.1	3.9
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae</i>	6.2	1.9	6.9	0.1	0.7
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Lachnospiraceae Anaerostipes</i>	6.2	0	0	0	0
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Ruminococcaceae</i>	0	1.8	2.9	0.6	1.6
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Ruminococcaceae Ethanoligenens</i>	0	1.8	0	0	0.3
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Ruminococcaceae Faecalibacterium</i>	12.5	1.5	0.5	0	0.6
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales Ruminococcaceae Oscillospira</i>	6.2	0.4	0.2	0.2	0.4
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales [Mogibacteriaceae] Anaerovorax</i>	0	0.2	1.6	0.3	0.8
<i>Firmicutes Clostridia Clostridiales [Tissierellaceae] Sedimentibacter</i>	0	0.1	3.5	1	1.2
<i>Proteobacteria Alphaproteobacteria Sphingomonadales Sphingomonadaceae</i>	0	0.2	1.1	0	0
<i>Proteobacteria Alphaproteobacteria Sphingomonadales Sphingomonadaceae Sphingomonas</i>	0	0.1	1.8	0	0
<i>Proteobacteria Deltaproteobacteria Desulfovibrionales Desulfovibrionaceae Desulfovibrio</i>	0	2	0.6	0.1	0.7
<i>Proteobacteria Deltaproteobacteria Desulfuromonadales Pelobacteraceae</i>	0	0.1	1.3	0.1	0.2
<i>Proteobacteria Epsilonproteobacteria Campylobacteriales Campylobacteraceae Arcobacter</i>	0	0.2	1	40.8	9.7
<i>Proteobacteria Epsilonproteobacteria Campylobacteriales Helicobacteraceae</i>	0	2.3	6.2	0.8	0.5
<i>Proteobacteria Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae</i>	6.2	6.1	3.6	0.1	0.8
<i>Proteobacteria Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae Enterobacter</i>	0	1.5	2.1	0	0.2
<i>Proteobacteria Gammaproteobacteria Pasteurellales Pasteurellaceae Haemophilus</i>	6.2	0	0	0	0
<i>Proteobacteria Gammaproteobacteria Thiotrichales Piscirickettsiaceae Thioalkalimicrobium</i>	0	2.1	0	0	0.1
<i>Synergistetes Synergistia Synergistales Dethiosulfovibrionaceae HA73</i>	0	1.7	1.9	0	1.8
<i>Synergistetes Synergistia Synergistales Thermovirgaceae</i>	0	4.7	2.4	0	0.1
<i>Thermotogae Thermotogae Thermotogales Thermotogaceae Kosmotoga</i>	0	2.8	0.5	0	0.7
Otros	0.6	41.9	21.6	5.6	18



## 7 Conclusiones

Con respecto al reactor de suelos activados en ambiente secuencial M-SR

- La remoción de lindano fue moderada, entre 54-66%
- La presencia de aceite de silicona no mostro un efecto positivo significativo en la remoción de lindano

Con respecto al reactor de suelos activados electrobioquímico

1<sup>er</sup> Experimento

- La biorremediación de lindano en suelo puede ser logrado en un EBQ con remociones similares a lo reportado en biorreactores de suelos activados anaerobios inoculado con inóculo sulfato reductor, reactores de suelos activados convencionales así como otras tecnologías de biorremediación y simultáneamente generar electricidad.

2<sup>do</sup> Experimento

- El mezclado y la suplementación con sustrato orgánico mejoró significativamente el desempeño del EBQ, la eficiencia de remoción de lindano y la producción de electricidad significativamente incrementaron.
- El EBQ no solamente presentó biorremediación de un plaguicida organoclorado, recalcitrante y tóxico, también suministro (como bioelectricidad) aproximadamente 14% de la energía requerida para mezclar el dispositivo.
- Se detectaron metabolitos intermediarios típicos de la ruta de degradación anaerobia de lindano que fueron similares a otros reportes en previas investigaciones en biorreactores de suelos activados convencionales en ambiente anaerobio.

3<sup>er</sup> Experimento

- Una dosis de 2000 mg L<sup>-1</sup> Tween 80 exhibió la mayor desorción de lindano del suelo a la fase acuosa, aunque el valor de desorción fue bajo a moderado.



- La biorremediación de lindano en suelo puede llevarse a cabo en un reactor de suelos activados electrobioquímico
- El reactor de suelos activados no solamente presenta la biorremediación de un compuesto tóxico y recalcitrante, también simultáneamente provee bioelectricidad, 20% de la energía requerida para mezclar el reactor.
- Los resultados del análisis de la comunidad bacteriana del reactor de suelos activados electrobioquímico, los fila más representativos fueron Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Sinergistetes.

El reactor de suelos activados electrobioquímico es una etapa significativa hacia la remediación verde/sustentable de suelos contaminados



## 8 Bibliografía

- Amadori, Ekkehard. Production and Use of HCH. International HCH and Halogenated Pesticides Forum (Compilation of 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> HCH forum 1991-1992).
- Amman, R.I.; Ludwing, W.; Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. 59:143-169.
- APHA, AWWA, WEF. (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> ed. APHA, Washington, DC.
- ATSDR, 2005. Toxicological Profile for Hexachlorocyclohexanes, U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, August, 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov>
- Bachmann, A.; Walet, P.; Wijnen, P.; De Bruin, W.; Huntjens, J.L.M.; Roelofsen, W.; Zehnder, A.J.B. (1988). Biodegradation of Alpha- and Beta Hexachlorocyclohexane in a Soil Slurry under Different Redox Conditions. *Appl Environ Microbiol*54:143-149.
- Baker, B.H.; Herson, D.S. (1994). *Bioremediation*. McGraw-Hill.
- Boopathy, R. (2003). Use of anaerobic soil slurry reactors for the removal of petroleum hydrocarbons in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52:161-163.
- Boopathy, R. (2005). Bioremediation of tetryl-contaminated soil using sequencing batch soil slurry reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation*55:293–297.
- Boyle, A.W.; Haggblom, M.M.; Young, L.Y. (1999). Dehalogenation of lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) by anaerobic bacteria from marine sediments and by sulfate reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*29:379-387.
- Brock, T.D.; Madigan, M.T. (1991). *Biology of Microorganism*. Prentice Hall. 6ta. Ed.
- Brox, G. (1993). *Bioslurry Treatment*. Proceedings Applied Bioremediation. N.J.
- Buser, H.R.; Muller, M.D. (1995). Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage under anaerobic conditions. *Environ Sci Technol*29:664-672.
- Camacho-Pérez, B.; Ríos-Leal, E.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review. *J Environ Manage*, 95: S306-S318.
- Camacho-Pérez, B.; Ríos-Leal, E.; Vazquez-Landaverde, P.A.; Garcia-Mena, J.; Barrera-Cortés, J.; Fava, F.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012b). Bioslurry treatment of a clayish soil polluted with lindane by sequential methanogenic-sulfate reducing bioreactors. *Environmental Engineering and Management Journal* 11(3) S16.
- Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Gonzalez-Peña, A.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; Huttley, G.A.; Kelley, S.T.; Knights, D.; Koenig, J.E.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; McDonald, D.; Muegge, B.D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J.R.; Turnbaugh, P.J.; Walters, W.A.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7:335–336.
- Chulhwan, P.; Tak-Hyun, K.; Sangyong, K.; Jinwon, L.; Seung-Wook, K. (2003). Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene Contaminated Soil in Slurry and Column Reactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*96:429–433.
- CICLOPLAFEST. 1996. Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. (CICLOPLAFEST).





- CICLOPLAFEST. 2000. Informe sexenal de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) 1994-2000. <http://www.stps.gob.mx/312/publicaciones/cicloplafest.htm>
- Cookson J.T. Bioremediation engineering: design and application New York, USA: McGraw-Hill Publishing Co.; 1995.
- Crawford, R. (1996). Bioremediation: Principles and Applications. Cambridge University Pres. ISBN: 0521470412.
- Cruz-Gomez, E. Bioremediación de un suelo con alto contenido de materia organica contaminado con paration y lindano mediante el empleo de reactor de suelos activados secuencial desnitrificante fungico. M Sc. Thesis, Interim Report. CINVESTAV del IPN, México D.F., México (2012).
- Cullen, D.W.; Hirsch, P.R. (1998). Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.* 30:983-993.
- DeSantis, T.Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E.L.; Keller, K.; Huber, T.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G.L. 2006 Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*, 72: 5069–5072.
- Di Gennaro, P.; Franzetti, A.; Bestetti, G.; Lasagni, M.; Pitea, D.; Collina, E. (2008). Slurry phase bioremediation of PAHs in industrial landfill samples at laboratory scale. *Waste Management*.28:1338–1345.
- Edgar, R.C. 2010 Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26 (19): 2460-2461.
- Endo, R.; Kamakura, M.; Miyauchi, K.; Fukuda, M.; Ohtsubo, Y.; Tsuda, M.; Nagata, Y. (2005). Identification and characterization of genes involved in the downstream degradation pathway of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J Bacteriol* 187:847-853.
- Environmental Health Criteria. (1991). World Health Organization, Geneva, Switzerland. Vol. 124
- Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D.P.Y.; Schroeder, E.D. (1998). *Bioremediation Principles*. McGraw-Hill. USA.
- Fava, F.; Piccolo, A. (2002). Effects of Humic Substances on the Bioavailability and Aerobic Biodegradation of Polychlorinated Biphenils in a Model Soil. *Biotechnology and Bioengineering* 77:204-211.
- Fedorovich, V.; Knighton, M.C.; Pagaling, E.; Ward, F.B.; Free, A.; Goryanin, I. 2009 Novel electrochemically active bacterium phylogenetically related to *arcobacter butzleri*, isolated from a microbial fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 7326–733.
- Fetzner, S.; Lingens, F.; (1994). Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications. *Microbiological Reviews* 58(4):641-685.
- Fierer, N.; Hamadyc, M.; Lauberb, C.L.; Knight, R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (46):17994-17999.
- Fischer, S.G., and Lerman, L.S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.
- Fuller, M.E.; Manning, J.F. (2004). Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Bioresource Technology* 91:123–133.
- García-Mena J. (2006). Environmental genomics: monitoring and characterization of microbial communities from bioreactors. *Environmental Biotechnology and Engineering. Proceedings of the Second International Meeting on Environmental Biotechnology and*



- Engineering (2IMEBE). Edited by: Héctor Mario Poggi-Varaldo, Elvira Ríos-Leal, Jaime García-Mena, Fernando Esparza-García, Ma. Teresa Ponce-Noyola, Ireri Robles-González, Isabel Sastre-Conde, Hervé Macarie, José Luis Sanz, Irene Watson-Craik, Eugenio Foresti, Danny Reible, and Claudio Garibay-Orijel 26-29 September, 2006. México City, México. Paper IMEBE 245.
- Gauthier, E.; De´ziel, E.; Villemur, R.; Juteau, P.; Le´pine, F.; Beudet, R. (2003). Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. *Journal of Applied Microbiology* 94:301–311.
- Gkika, E.; Kormali, P.; Antonaraki, S.; Dimoticali, D.; Papaconstantinou, E.; Hiskia, A. (2004). Polyoxometallates as effective photocatalysts in water purification from pesticides. *International Journal of Photoenergy* 6:227-231.
- Haas, B.J.; Gevers, D.; Earl, A.M.; Feldgarden, M.; Ward, D.V.; Giannoukos, G.; Ciulla, D.; Tabbaa, D.; Highlander, S.K.; Sodergren, E.; Methe´, B.; DeSantis, T.Z.; Petrosino, J.F.; Knight, R.; Birren, B.W. 2011 Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res*, 21: 494-504.
- Halliday, D.; Resnick, R.; Walker, J. In: *Fundamentals of Physics*. 7th ed.. New York: John Wiley & Sons Co., ISBN 978-0-471-21643-8; 2004.
- Hardie, D.W.F. (1964) .Benzene hexachloride. In Kirk, R.E. and Othmer, D.F. (eds.), *Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, New York (USA).267-281.
- Heinz van Pée, K.; Unversucht, S.; (2003). Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* 52:299–312.
- Huang, D.Y.; Zhou, S.G.; Chen, Q.; Zhao, B.; Yuan, Y.; Zhuang, L. (2011) Enhanced anaerobic degradation of organic pollutants in a soil microbial fuel cell. *Chem Eng J*, 172: 647– 653.
- Hund, K.; Traunspurger, W. (1994). Ecotox-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere* 29:371-390.
- Instituto Nacional de Ecología, 2007. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>.
- Janikowski, T.B.; Velicogna, D.; Punt, M.; Dauguli, A.J. (2002). Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:368-376
- Janssen, D.B.; Oppentocht, J.E.; Poelarends, G.J. (2001). Microbial dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology* 12:254–258.
- Jantsch, T.G.; Mattiasson, B. (2004). An automated spectrophotometric system for monitoring buffer capacity in anaerobic digestion processes. *Water Research* 38:3645–3650
- Junesson, C.; Ward, O.P.; Singh, A. (2001). Biodegradation of bis (2-ethylhexyl) phthalate in a soil slurry-sequencing batch reactor. *Process Biochemistry* 37:305–313.
- Kim, H.M.; Chae, N.; Jung, J.Y.; Lee, Y.K. (2013) Isolation of facultatively anaerobic soil bacteria from Ny-A° lesund, Svalbard. *Polar Biol* 36:787–796.
- Kipopoulou, A.M.; Zouboulis, A.; Samara, C.; Kouimtzis, T. (2004). The fate of lindane in the conventional activated sludge treatment process, *Chemosphere* 55:81-91
- Kumari, R.; Subudhi, S.; Suar, M.; Dhingra, G.; Raina, V.; Dogra, C.; Lal, S.; Meer, J.R.; Holliger, C.; Lal, R. (2002). Cloning and Characterization of lin Genes Responsible for the Degradation of Hexachlorocyclohexane Isomers by *Sphingomonas paucimobilis* Strain B90. *Applied and Environmental Microbiology* 68(12):6021-6028.
- Liu, H.; Ramnarayanan, R.; Logan, B.E. (2004). Production of electricity during wastewater



- treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol*, 38(7):2281–2285.
- Logan, B. E.; Hamelers, B.; Rozendal, R.; Schroder, U.; Keller, J.; Freguia, S.; Aelterman, P.; Verstraete, W.; Rabaey, K. (2006). Microbial fuel cells: methodology and technology. *Environ Sci Technol*, 40(17): 5181-5192.
- Lu, N.; Zhou, S.G.; Zhuang, L.; Zhnag, J.T.; Ni, J.R. (2009). Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. *Biochem. Eng. J.*, 43: 246-251.
- MacRae, I.C.; Raghu, K.; Bautista, E.M.; (1969). Anaerobic degradation of the insecticide lindane by *Clostridium* sp. *Nature*221:859-860.
- Manickam, N.; Mau, M.; Schlömann, M. (2006). Characterization of the novel HCH-degrading strain, *Microbacterium* sp. ITRC1. *Appl Microbiol Biotechnol*69:580–588.
- Manickam, N.; Misra, R.; Mayilraj, S. (2007). A novel pathway for the biodegradation of  $\gamma$  - hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. Strain ICH12. *Journal of Applied Microbiology*102:1468-1478.
- Manickam, N.; Reddy, M.K.; Saini, H.S.; Shanker, R. (2008). Isolation of hexachlorocyclohexane degrading *Sphingomonas* sp. By dehalogenase assay and characterization of genes involved in  $\gamma$ -HCH degradation. *Journal of Applied Microbiology*104:952-960.
- Marcoux, J.; Déziel, E.; Villemur, R.; Lépine, F.; Bisailon, J.G.; Beudet, R. (2000) Optimization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in two liquid phase bioreactor. *J Appl Microbiol*88:655-662.
- Medina-Valtierra, J.; García-Servin, J.; Frausto-Reyes, C.; Calixto, S. (2005). Encapsulamiento de anatasa comercial en películas delgadas de  $\text{TiO}_2$  depositadas sobre microrodillos de vidrio para la fotodegradación del fenol. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 4(2):191-200.
- Mencia, M.; Martínez, F.A.; Alcalde, M. (2006). Identification of a  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane dehydrochlorinase (LinA) variant with improved expression and solubility properties. *Biocatalysis and Biotransformation* 24(3):223-230.
- Mertens, B.; Blothe, C.; Windey, K.; De Windt, W.; Vertsraete, W. (2007). Biocatalytic dechlorination of lindane by nanoscale particles of Pd (0) deposited on *Shewanella oneidensis*. *Chemosphere* 66(1):99-105.
- Middeldorp, P.J.M.; Jasper, M.; Zehnder, A.J.B.; Schraa, G. (1996). Biotransformation of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environ Sci Technol*30:2345-2349.
- Miyauchi, K.; Lee, H.S.; Fukuda, M.; Takagi, M.; Nagata, Y. (1999). Cloning and characterization of LinR involved in regulation of downstream pathway for  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol*. 68:1803-1807.
- Miyauchi, K.; Suh, S.K.; Nagata, Y.; Takagi, M. (1998). Cloning and sequencing of a 2, 5-dichlorohydroquinone reductive dehalogenase gene whose product is involved in degradation of  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane by *Sphingomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol*180:1354-1359.
- Mohn, W.W.; Mertens, B.; Neufeld, J.D.; Verstraete, W.; Lorenzo, V. (2006). Distribution and phylogeny of hexachlorocyclohexane degrading bacteria in soils from Spain. *Environmental Microbiology*. 8(1):60–68.
- Muyzer, G.; de Waal, E.C.; Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*. 59: 695–700.



- Muyzer, G.; Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127–141
- Nagasawa, S.; Kikuchi, R.; Nagata, Y.; Takagi, M.; Matsuo, M. (1993). Aerobic mineralization of  $\gamma$ -HCH by *Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere* 26:1719-1728.
- Nagata, Y.; Endo, R.; Ito, M.; Ohtsubo, Y.; Tsuda, M. (2007). Aerobic degradation of lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:741-752.
- Nagata, Y.; Futurama A.; Miyauchi, K.; Takagi, M. (1999). Two different types of dehalogenases, LinA y LinB involved in  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *J Bacteriol* 181:5409-5413.
- Nagata, Y.; Hatta, T.; Imai, R.; Kimbara, K.; Fukuda, M.; Yano, K.; Takagi, M. (1993). Purification and characterization of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH) dehydrochlorinase (LinA) from *Pseudomonas paucimobilis*. *Biosci Biotech Biochem* 57:1582-1583.
- Nagata, Y.; Mori, K.; Takagi, M.; Murzin, A.; Damborsky, J. (2001). Identification of Protein Fold and Catalytic Residues of  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane Dehydrochlorinase LinA. *Proteins: Structure, fuction, and Getenics*.45:471-477.
- Nano, G.; Borroni, A.; Rota, R. (2003). Combined slurry and solid-phase bioremediation of diesel contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*.B100:79–94.
- Nawab, A.; Aleem, A.; Malik, A. (2003). Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to  $\gamma$ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology* 88:41–46.
- Neef, J.M.; Van de Peer, Y.; Hendriks, L.; De Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 18:2237-2317.
- Neufeld, J.D.; Mohn, W.W.; de Lorenzo, V. (2006) Composition of microbial communities in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils from Spain revealed with a habitat-specific microarray. *Environmental Microbiology*. 8(1), 126–140
- Oakley, A.J.; Prokop, Z.; Bohac, M.; Kmunicek, J.; Jedlicka, T.; Monincová, M.; Kuta-Smantanová, I; Nagata, Y.; Damborsky, J.; Wilce, M. (2002). Exploring the Structure and Activity of Haloalkane Dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: Evidence for Product- and Water-Mediated Inhibition. *Biochemistry* 41:4847-4855.
- Okeke, B.C.; Siddique, T.; Arbestain, M.C.; Frankenberger, W.T. (2002). Biodegradation of  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane (Lindane) and  $\alpha$ -Hexachlorocyclohexane in Water and a Soil Slurry by a *Pandoraea* Species. *J. Agric. Food Chem* 50:2548-2555.
- Park, J.I.; Yun, Y.S; Park, J.M. (2002). Long-term operation of slurry bioreactor for decomposition of food wastes. *Bioresource Technol* 84(1):101-104.
- Phillips, T.M.; Seech, A.G.; Lee, H.; Trevors, J.T. (2005). Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation* 16(4):363-392.
- Poggi-Varaldo, H.M.; Carmona Martínez, A.; Vázquez-Larios A.L.; Solorza-Feria, O. (2009). Effect of Inoculum Type on the Performance of a Microbial Fuel Cell Fed with Spent Organic Extracts from Hydrogenogenic Fermentation of Organic Solid Wastes. *J New Mat Electrochem Systems*, 12:49-54.
- Poggi-Varaldo, H.M.; Oleszkiewicz, J. (1992). Anaerobic co-composting of municipal solid waste sludge at high total solids waste and waste sludge at high total solids levels. *Environ Technol* 13:409-421.



- Polese, L.; Minelli, E.V.; Jardim, E.F.G.; Ribeiro, M.L. (1996). Small scale method for the determination of selected organochlorine pesticides in soil. *J Anal Chem* 354:474-476.
- Prakash, S.; Tandon, G.S.; Seth, T.D.; Joshi, P.C. (2002). The Role of Reactive Oxygen Species in the Degradation of Lindane and DDT. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 (3):1284-1288.
- Prasanna, D.; Venkata-Mohan, S.; Purushotham-Reddy, B.; Sarma, P.N. (2008). Bioremediation of anthracene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode. *Journal of Hazardous Materials* 153:244–251.
- Quan, X.; Niu, J.; Chen, S.; Chen, J.; Zhao, Y.; Yang, F. (2003). Effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, organic matter and carbonate on photocatalytic degradation of lindane in the sediment from the Liao River, China. *Chemosphere* 52:1749-1755.
- Quintero, J.C.; Lú-Chau, T.A.; Moreira, M.T.; Feijoo, G.; Lema, J.M. (2007). Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry batch bioreactor. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60:319-326.
- Quintero, J.C.; Moreira, M.T.; Feijoo, G.; Lema, J.M. (2005). Anaerobic degradation of hexachlorocyclohexane isomers in liquid and soil slurry systems. *Chemosphere* 61:528-536.
- Quintero, J.C.; Moreira, M.T.; Lema, J.M.; Feijoo, G. (2006). An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. *Chemosphere* 63:1005-1013.
- Rabaey, K.; Lissens, G.; Steven D. Siciliano, S.D.; Verstraete, W. (2003). A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency. *Biotechnology Letters* 25: 1531–1535.
- Ramakrishna, M.; Venkata-Mohan, S.; Shailaja, S.; Narashima, R.; Sarma, P.N. (2008). Identification of metabolites during biodegradation of pendimethalin in bioslurry reactor. *Journal of Hazardous Materials* 151:658–661.
- Rao, J.R.; Richter, G.J.; Vonsturm, F.; Weidlich, E. (1976) Performance of glucose electrodes and characteristics of different biofuel cell constructions. *Bioelectro chem Bioenerg* 3: 139–150.
- Rezaei, F.; Richard, T.L.; Logan, B.E. (2009). Analysis of chitin particle size on maximum power generation, power longevity, and Coulombic efficiency in solid–substrate microbial fuel cells. *Journal of Power Sources* 192:304–309.
- Ringelberg, D.B.; Talley, J.W.; Perkins, E.J.; Tucker, S.G.; Luthy, R.G.; Bower, E.J.; Fredrickson, H.L. (2001). Succession of Phenotypic, Genotypic, and Metabolic Community Characteristics during In Vitro Bioslurry Treatment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments. *Applied And Environmental Microbiology* 67 (4):542–1550.
- Ripley, L.E.; Boyle, W.C.; Converse, J.C. (1986). Improved alkalimetric monitoring for the anaerobic digestion of high strength wastes. *J Water Pollut Control Fed* 58:406-411.
- Robles-González, I.; Fava, F.; Poggi-Varaldo, H.M. (2008a). A Review on Slurry Bioreactors for Bioremediation of Soils and Sediments. *Microbial Cell Factories*, 7: Art. No. 5 February 29, 2008.
- Robles-González, I.; Ríos-Leal, E.; Ferrera-Cerrato, R.; Esparza-García, F.; Rinderknecht-Seijas, N. Poggi-Varaldo, H.M. (2006). Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: Effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. *Procces Biochemistry* 41:1951-1960.



- Robles-González, I.V. (2008b). Biorremediación de suelos minerales orgánico-arcillosos contaminados con agroquímicos utilizando reactores de suelos activados. Tesis de doctorado. CINVESTAV del IPN, México D.F., México.
- Robles-González, I.V.; Ríos-Leal, E.; Sastre-Conde, I.; Fava, F.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Slurry bioreactors with simultaneous electron acceptors for bioremediation of an agricultural soil polluted with lindane. *Process Biochemistry*. 47(11):1640-1648
- Roose-Amsaleg, C.L.; Garnier-Sillam, E.; Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*. 18:47-60
- Rubilar, O.; Feijoo, G.; Diez, C.; Lu-Chau, T.A.; Moreira, M.T.; Lema, J.M. (2007) Biodegradation of Pentachlorophenol in Soil Slurry Cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracyllum discolor*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46:6744-6751
- Sathish-Kumar, K.; Solorza-Feria, O.; Hernández-Vera, R.; Vazquez-Huerta, G.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012 a). Comparison of various techniques to characterize a single chamber microbial fuel cell loaded with sulfate reducing biocatalysts. *J New Mat Electrochem Systems*, 15 (3):195-201.
- Sathish-Kumar, K.; Solorza-Feria, O.; Vázquez-Huerta, G.; Luna-Arias, J.P.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012 b). Electrical Stress-directed Evolution of Biocatalysts Community Sampled from A Sodic-saline Soil for Microbial Fuel Cells. *J New Mat Electrochem Systems*, 15 (3):181-186.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. SERMANAT 2004.
- Shailaja, S.; Ramakrishna, M.; Venkata-Mohan, S.; Sarma, P.N. (2007). Biodegradation of di-n-butyl phthalate (DnBP) in bioaugmented bioslurry phase reactor. *Bioresource Technology*98: 1561–1566
- Shailaja, S.; Venkata-Mohan, S.; Rama-Krishna, M.; Sarma, P.N. (2008). Degradation of diethylhexyl phthalate (DEHP) in bioslurry phase reactor and identification of metabolites by HPLC and MS. *International Biodeterioration & Biodegradation*62:143–152.
- Shyh-Yau, W.; Cumaraswamy, V. (2001). Biodegradation of Naphthalene-Contaminated Soils in Slurry Bioreactors. *Journal of Environmental Engineering* 127:748-754.
- Tetsuji, O.; Alcántara-Garduño, M.E.; Masahiro, S.; Chikara, M.; Tomohiro, K.; Wataru, N.; Mitsumasa, O. (2007). Enhancement of biodegradation of oil adsorbed on fine soils in a bioslurry reactor. *Chemosphere* 68:281–286.
- Trantírek, L.; Hynková, C.; Nagata, Y.; Murzin, A.; Ansorgova, A.; Sklenár, V.; Damborsky, J. (2001). Reaction Mechanism and Stereochemistry of  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane Dehydrochlorinase LinA. *The Journal of Biological Chemistry* 276(11):7734-7740.
- Tu, C.M. (1975) Interaction between lindane and microbes in soils. *Arc Microbiol.* 105 (2):131-134.
- Valentín, L.; Lu-Chau, T.A.; López, C., Feijoo, G., Moreira, M.T.; Lema, J.M. (2007). Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Process Biochemistry*42: 641–648.
- Van Eekert, M.A.; Vanras, N.J.; Mentink, G.; Rijnaarts, H.M.; Stams, A.M.; Andgosseschraa, J.F. (1998). Anaerobic Transformation of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora. *Environ Sci Technol*32:3299-3304.
- Varo-Arguello, W.E.; Camacho-Pérez, B.; Ríos-Leal, E.; Vázquez-Landaverde, P.A.; Ponce-Noyola, M.T.; Barrera-Cortés, J.; Sastre-Conde, I.; Rinderknecht-Seijas, N.F.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Triphasic slurry bioreactors for the bioremediation of lindane-impacted soil under aerobic and anaerobic conditions. *Environ Eng Manage J*11 (10):1811-



- 1823.
- Vázquez-Larios, A.L.; Solorza-Feria, O.; Vázquez-Huerta, G.; Esparza-García, F.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2011 b). Effects of architectural changes and inoculum type on internal resistance of a microbial fuel cell designed for the treatment of leachates from the dark hydrogenogenic fermentation of organic solid wastes. *Int J Hydrogen Energy*, 36:6199-6209.
- Vázquez-Larios, A.L.; Solorza-Feria, O.; Vázquez-Huerta, G.; Esparza-García, F.; Ríos-Leal, E.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2010). A New Design Improves Performance of a Single Chamber Microbial Fuel Cell. *J. New Mat. Electrochem. Systems*, 13: 219-226.
- Vázquez-Larios, A.L.; Solorza-Feria, O.; Vázquez-Huerta, G.; Ríos-Leal, E.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2011a). Internal Resistance and performance of microbial fuel cells: Influence of cell configuration and temperature. *J New Mat Electrochem Systems*, 14: 99-105.
- Venkata-Mohan, S., Sirisha, K.; Sreenivasa-Rao, R.; Sarma, P.N. (2007). Bioslurry phase remediation of chlorpyrifos contaminated soil: Process evaluation and optimization by Taguchi design of experimental (DOE) methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.68:252–262.
- Venkata-Mohan, S.; Prasanna, D.; Purushotham-Reddy, B.; Sarma, P.N. (2008). Ex situ bioremediation of pyrene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode: Influence of bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62:162–169.
- Venkata-Mohan, S.; Purushotham-Reddy, B.; Sarma, P. (2009). Ex situ slurry phase bioremediation of chrysene contaminated soil with the function of metabolic function: Process evaluation by data enveloping analysis (DEA) and Taguchi design of experimental methodology (DOE). *Bioresource Technology*100:164–172.
- Venkata-Mohan, S.; Sirisha, K.; Chandrasekhara-Rao, N.; Sarma, P.N.; Jayarama-Reddy, S. (2004) Degradation of chlorpyrifos contaminated soil by bioslurry reactor operated in sequencing batch mode: bioprocess monitoring. *Journal Hazardous Materials B*116:39-48.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure Appl Chem* 73(7):1163-1172.
- Vieublé-Gonod, L. ; Martin-Laurent, F. ; Chenu, C. (2006). 2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-D degrading communities in soil. *FEMS Microbiol Ecol* 58:529-537.
- Wang, X.; Cai, Z.; Zhou, Q.; Zhang, Z.; Chen, C. (2011). Bioelectrochemical stimulation of petroleum hydrocarbon degradation in saline soil using u-tube microbial fuel cells. *Biotechnol Bioeng*, 109(2):426-433.
- Whiteley, A.S.; Jenkins, S.; Waite, I.; Kresoje, N.; Payne, H.; Mullan, B.; Allcock, R.; O'Donnell, A. (2012). Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *J Microbiol Methods*, 91: 80–88.
- Yan, Z.; Song, N.; Cai, H.; Tay, J.H.; Jiang, H. (2012). Enhanced degradation of phenanthrene and pyrene in freshwater sediments by combined employment of sediment microbial fuel cell and amorphous ferric hydroxide *J Hazard Mater*, 199–200: 217– 225.
- Zaleska, A.; Hupka, J.; Wierowski, M.; Biziuk, M. (2000). Photocatalytic degradation of lindane, p,p'-DDT and methoxychlor in an aqueous environment. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 135(2-3):213-220.
- Zaybak, Z.; Pisciotta, J.M.; Tokash, J.C.; Logan, B.E. (2013). Enhanced start-up of anaerobic facultatively autotrophic biocathodes in bioelectrochemical systems. *Journal of Biotechnology*, 168: 478-485.



- Zhang, C.; Daprato, R.C.; Nishino, S.F.; Spain, J.C.; Hughes, J.B. (2001) Remediation of dinitrotoluene contaminated soils from former ammunition plants: soil washing efficiency and effective process monitoring in bioslurry reactors. *Journal of Hazardous Materials* B87:139–154.
- Znad, H.; Kasahara, N.; Kawase, Y. (2006) Biological decomposition of herbicides (EPTC) by activated sludge in a slurry bioreactor. *Process Biochemistry* 41:1121-1128.





## 9 Anexos

### 9.1 Anexo A. Presuntivo para determinar si la biomasa está adsorbiendo el lindano

#### 9.1.1 Propósito

Determinar la concentración de lindano y metabolitos adsorbidos sobre en sólidos del biorreactor inoculador.

#### 9.1.2 Equipo

1.1. Cromatógrafo de gases Perkin Elmer equipado con detector de captura de electrones. Columna capilar Supelco (30 m x 0.25 mm).

1.2. Rotavapor

#### 9.1.3 Reactivos y Stock

1.3. Lindano 97% pureza

1.4. Hexano grado HPLC

1.5. Solución isotónica

Disolver 8.5g de cloruro de sodio en 1L de agua destilada.

1.6. Solución Stock de lindano (Robles-Molina *et al.*, 2010)

La solución estándar stock de lindano se prepara en hexano a una concentración de 1mg/L. Posteriormente se preparan diluciones en hexano partiendo de la solución en un rango de concentración de 0.1-0.02mg/L de lindano.

#### 9.1.4 Procedimiento

1. Purgar el reactor inoculador (muestra)
2. En una alícuota de la muestra determinar sólidos suspendidos totales (Triplicado)
3. La otra parte de muestra se centrifuga ( $V_m$ , L)
4. Desechar el sobrenadante y el sedimento re-suspenderlo en medio isotónico (el volumen del medio isotónico es igual al sobrenadante desechado)



5. Etapa de extracción (Manonmani *et al.*, 2000; Okeke *et al.*, 2002; Robles-Molina *et al.*, 2010)
  - 5.1 Agregar 1 volumen de hexano a la muestra
  - 5.2 Mezclar vigorosamente durante 15 minutos
  - 5.3 Separar la fase acuosa de la fase orgánica en un embudo de separación

**Nota:** La etapa de extracción se realiza en total 3 veces a la misma muestra
6. Juntar la fase orgánica obtenida de las 3 extracciones realizadas
7. Las trazas de agua son removidas agregando sulfato de sodio anhídrido
8. El extracto es cuidadosamente evaporado hasta que casi este seco usando un evaporador rotatorio equipado con un baño maría a 30°C
9. El hexano recuperado es re-suspendido en un volumen conocido de hexano,  $V_r$  (L)
10. Un volumen conocido fue inyectado en CG-ECD para la determinación de lindano (Previamente se realiza una curva patrón de lindano disuelto en hexano),  $V_j$  (L)

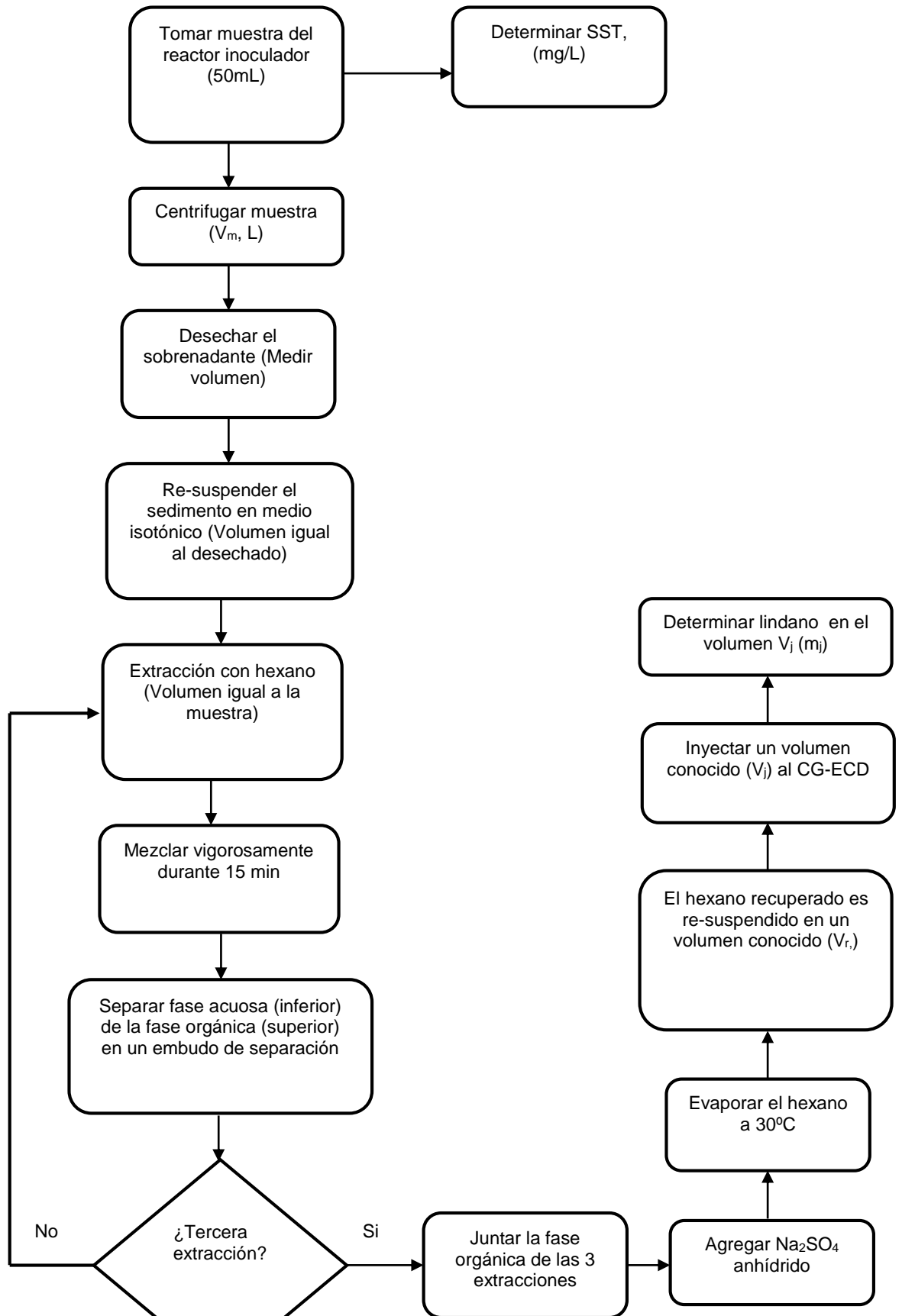


Figura 33. Diagrama de flujo del proceso



### 9.1.5 Cálculos

$$m = m_j(\text{mg lindano}) * V_r(\text{L}) * \frac{1}{[\text{SST}] * V_m(\text{mg sólido seco})} * \frac{1000\text{mg sólido seco}}{\text{g sólido seco}}$$

$$m = m_j * V_r * \frac{1000}{V_m[\text{SST}]}$$

**Dónde:**

**m:** mg lindano/g sólido seco biorreactor

**m<sub>j</sub>:** Lindano en el volumen de muestra (mg)

**V<sub>r</sub>:** Volumen de hexano (L)

**V<sub>j</sub>:** Volumen inyectado en el cromatógrafo (L)

**V<sub>m</sub>:** Volumen de muestra (L)

**SST:** Sólidos suspendidos totales (mg/L)



### 9.1.6 Resultados y Discusión

El inoculo metanogénico presentó una adsorción de lindano de 0.626 mg lindano/g biomasa seca, para el inoculo sulfato reductor la adsorción fue de 0.465 mg lindano/g biomasa seca. Para evaluar la técnica de extracción de lindano de la biomasa se llevó a cabo la determinación del % de recuperación en donde se obtuvo de 88%.

Se han propuesto diferentes mecanismos responsables de la acumulación de compuestos orgánicos en la biomasa microbiana. Sin embargo, la adsorción es el mecanismo primario en el cual los cationes son acumulados en la biomasa microbiana. Ware and Roan (1970) reportaron que la adsorción de compuestos orgánicos altamente hidrofóbicos en los microorganismos varía de especie a especie lo cual está relacionado directamente con el contenido de lípidos de los microorganismos. El contenido de lípidos para las bacterias se encuentra en un rango de 10-40% del total del peso seco de la célula (Davis *et al.*, 1980).

En diferentes investigaciones se ha llevado a cabo el estudio de la adsorción de compuestos orgánicos tóxicos en lodos microbianos (Bridle, 1982; Petrusek *et al.*, 1983). Carrillo-Pérez *et al.* (2004) observó que el DDT se encontraba adherido a la biomasa de un consorcio microbiano en un 50%, por lo cual el DDT se encontraba indisponible para su degradación por el consorcio microbiano. Por otro lado You *et al.* (1996) atribuyen la adsorción del DDT a su solubilización en los lípidos de la pared celular los cuales se encuentran en mayor proporción en los organismos Gram negativos.



## 9.2 Anexo B. Demanda bioquímica de oxígeno de la materia orgánica soluble del extracto de suelo ( $DBO_{\text{moses}}$ )

La demanda bioquímica de oxígeno es una estimación de la cantidad de oxígeno que se requiere para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua por medio de una población microbiana heterogénea. El método consiste en un procedimiento de bioensayos donde se mide el oxígeno consumido por los microorganismos al utilizar como alimento la materia orgánica presente en el agua de desecho.

El procedimiento usual recomienda que la temperatura de incubación debe ser constante (20°C aprox.) y el caso de usar una alícuota el agua de dilución debe airearse previamente para asegurar que el contenido de gases disueltos sea constante (cercano al punto de saturación) se llenan tres botellas para DBO con la muestra y a una de ellas se le determina el oxígeno disuelto inmediato, los dos restantes se incuban a 20°C durante 5 días.

Después de este tiempo se les determina la cantidad de oxígeno disuelto remanente. La DBO será igual a la cantidad de oxígeno disuelto inicial menos el oxígeno disuelto remanente al quinto día dividido entre el % de dilución.

### 9.2.1 Inoculo para ensayo DBO para extracto de suelo

- a) Se prepara un agua residual sintética (ARS) con 150 mg/L de azúcar y 150 mg/L de caldo peptonado en agua de llave previamente hervida. El extracto de suelo (EXS) se prepara de la siguiente manera: 1.5g de suelo se diluye en 400mL de agua de dilución. Si es necesario se ajusta a un pH de 7 con NaOH o ácido sulfúrico según sea el caso.
- b) En un frasco marcar el volumen que ocupa 200 mL.
- c) Colocar en el frasco de 200mL de agua residual doméstica o licor de lodos activados junto con 20g de suelo cribado.
- d) Borbotear aire moderadamente en forma continua. Preferentemente purificando con una trampa que atrape polvo y aceite que puede contener la tubería de la toma de aire.
- e) A las 24 h cerrar el aire, dejar tranquilizar y reponer el nivel de agua con agua destilada si es necesario volver a mezclar rotando el frasco suavemente y dejar sedimentar.



- f) Extraer 20 mL de sobrenadante y adicionar 2 mL de EXS y 18 mL de ARS.
- g) Repetir el paso d y e.
- h) Extraer 20 mL de sobrenadante y adicionar 4 mL de EXS y 16 mL de ARS. Continuar así sucesivamente hasta llegar al 10° día donde se adiciona 20 mL de EXS y se elimina por completo el ARS

**NOTA:**

Para inocular las botellas de DBO<sub>5</sub> se debe dejar sedimentar antes de tomar el volumen de inóculo a utilizar, lo mismo se debe hacer al alimentar y sacar muestra del matraz “generador de inóculo”; primero tomar la muestra de líquido de sobrenadante y después adicionar la alimentación.

### 9.2.2 Preparación de agua de dilución

Agua destilada

El agua que se use para la preparación de las soluciones y para el agua de dilución debe ser de la más alta calidad, destilada en alambriques de cristal o con refrigerantes de estaño; debe contener menos de 0.01 mg/L de Cu y debe estar exenta de cloro, cloraminas, alcalinidad cáustica, sustancias orgánicas o ácidos.

**a) Solución amortiguadora de fosfato.**

Disuelva 8.5g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  , 21.75g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 33.4g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 1.7g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en 500mL de agua destilada y diluya en 1 litro. El pH de esta solución amortiguadora debe ser 7.2, sin ajuste alguno. No debe presentar ningún tipo de crecimiento biológico si se conserva en la incubadora.

**b) Solución de sulfato de magnesio.**

Disuelva 22.5g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y diluya a 1 litro.

**c) Solución de cloruro de calcio**

Disuelva 27.5g de  $\text{CaCl}_2$  anhidro en agua destilada y diluya a 1 litro.

**d) Solución de cloruro férrico**

Disuelva 0.25g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y diluya en 1 litro.



Viértase el volumen deseado de agua destilada en un frasco adecuado y agréguese 1mL de cada una de las soluciones: amortiguadora de fosfatos, sulfatos de magnesio, cloruro de calcio y cloruro férrico por cada litro de agua. El agua de dilución se airea durante 24 horas para ajustar la concentración de oxígeno de 6.5-7.5 mg/L.

### **Soluciones de ácidos o álcalis, 1N.**

Para la neutralización de las muestras de desechos que sean cáusticas o ácidas.

### **9.2.3 Rangos de dilución para DBO**

El analista tiene la responsabilidad en decidir que dilución debe de hacer para la determinación de DBO. Usualmente es mejor hacer 3 diferentes diluciones. Cuando la concentración de una muestra es conocida con seguridad, dos diluciones son suficientes. Cuando es desconocida la concentración de una muestra implica cubrir un amplio rango para las diluciones y en algunos casos es necesario realizar 4 diluciones. En ningún caso esto podría ser una superposición de la DBO medible por diluciones sucesivas.





### Demanda Bioquímica de oxígeno con varias diluciones de muestra

Usando %		Pipeteo directo en botes de 300mL	
%	Rango de DBO	mL	Rango de DBO
0.01	20 000-70 000	0.02	30 000 – 105 000
0.02	10 000 -35 000	0.05	12 000 – 42 000
0.05	4 000 - 14 000	0.10	6 000 – 21 000
0.1	2 000-7000	0.20	3 000 – 10 500
0.2	1 000-3500	0.50	1 200 – 4 200
0.5	400 -1400	1.0	600-2100
1.0	200-700	2.0	300-1050
2.0	100-350	5.0	120-420
5.0	40-140	10.0	60-210
10.0	20-70	20.0	30-105
20.0	10-35	50.0	12-42
50.0	4-14	100.0	6-21
100.0	0-7	300.0	0-7

#### 9.2.4 Preparación de la muestra de suelo para determinación de DBO

Las muestras de suelo se secan en un horno convencional a 60°C durante 3 días es tamizado en un tamiz con tamaño de partícula de 0.25mm.

#### 9.2.5 Medición de DBO

A 20g de suelo previamente secado y tamizado se le agrega 60mL de medio mineral, se homogeniza y posteriormente se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio. Después se realizan diferentes diluciones en agua de dilución, el pH se ajusta a 6.5-7.5 agregando ácido sulfúrico 1N o hidróxido de sodio 1N y se afora a 1L.

En una botella Winkler se colocan 300mL de esta dilución, (se realizan 3 diluciones, Anexo 1) y el inóculo correspondiente. La concentración de oxígeno



disuelto es medida por el método de Winkler (Anexo 2). También se corren 3 blancos (agua de dilución) y 3 controles inoculados (16mL de inóculo en 1000mL de agua de dilución). Las muestras, el blanco y los controles son incubados en la obscuridad a 20°C. La concentración de oxígeno disuelto es medida en tiempo 0 y 5 días.

### Concentración de $DBO_5$ en agua

$$DBO_{agua} = \frac{D_1 - D_2 - (B_1 - B_2)f}{P}$$

#### Donde

$D_1$ : Oxígeno disuelto de la muestra diluida a “P” decimal y a  $t = 0$  días.

$D_2$ : Oxígeno disuelto de la muestra diluida a “P” decimal y a  $t = 5$  días.

$B_1$ : Oxígeno disuelto del inóculo diluido a “h” decimal a  $t = 0$  días.

$B_2$ : Oxígeno disuelto del inóculo diluido a “h” decimal a  $t = 5$  días.

F: g/h

g: Porcentaje de dilución de inóculo en agua de dilución que se usará para diluir muestra

h: concentración decimal de inóculo en el agua de dilución, cuando el inóculo se corre como muestra.

P: Concentración decimal de muestra en el agua de dilución inoculada

### Concentración de $DBO_5$ en suelo

$$DBO_{suelo} = \frac{(D_1 - D_2) - BOD_5}{WVb/Vd}$$



## Donde

$D_1$ : Oxígeno disuelto de la muestra a  $t= 0$  días.

$D_2$ : Oxígeno disuelto de la muestra a  $t= 5$  días.

$DBO_5$ : Promedio de oxígeno disuelto de los 3 controles y 3 inoculados

$W$ : Peso del suelo seco = 1.5g

$V_b$ : volumen de la botella de DBO (mL)

$V_d$ : Volumen de agua de dilución de DBO = 400 mL

### 9.2.6 Resultados

La  $DBO_{\text{moses}}$  obtenida fue de 3725 mg  $DBO_5$ /kg suelo seco y la  $DQO_{\text{moses}}$  fue de 5100 mg  $DQO$ /kg suelo seco, por lo cual el factor de degradabilidad de la materia orgánica ( $\beta$ ) fue de 0.73, lo que significa que la materia orgánica presente en el suelo es degradable.



### **9.3 Anexo C. Medición de oxígeno disuelto por medio del método de Winkler modificado (4500-O Oxygen dissolved, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater)**

Este método tuvo su origen en 1888, sin embargo, es el método más usado en el campo y en su caso en el laboratorio, debido a su gran exactitud, manejabilidad y costo. Se basa en reacciones de óxido-reducción.

#### **9.3.1 Principio**

Este análisis se basa en la adición de una solución divalente de manganeso, seguida de una fuerte alcalinización. El oxígeno disuelto presente en la muestra oxida rápidamente una cantidad equivalente del hidróxido de manganeso disperso pasando a hidróxidos en estados de valencia mayor, formando un precipitado café. En presencia de iones yoduro y seguido de una acidificación, el manganeso oxidado revierte el estado divalente con la liberación del yodo, en una cantidad equivalente al contenido original de oxígeno disuelto en la muestra. El yodo se titula con una solución valorada de tiosulfato de sodio, usando almidón como indicador. La modificación al método consiste en la adición de azida de sodio, que elimina las interferencias provocadas por los nitritos y se recomienda cuando estos se encuentran en concentraciones mayores a 50mg/L.

#### **9.3.2 Preparación de reactivos**

##### **1. Sulfato Manganeso $MnSO_4 \cdot H_2O$**

- a) Disolver 480g de  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , ó 400g  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  ó 364g  $MnSO_4$  en agua destilada.
- b) Filtrar y diluir a 1 litro.

##### **2. Álcali yoduro azida**

- a) Pesar 500g de NaOH (ó 700g de KOH) y 135g de NaI (ó 150g de KI) en un vaso de precipitado.
- b) Disolver cuidadosamente en agua destilada y diluir a 1 litro.



c) A la solución anterior agregar 10g de  $\text{NaN}_3$  (azida de sodio) disueltos en 40mL de agua.

**NOTA:** Las sales de sodio o de potasio pueden usar indistintamente. Este reactivo no debe producir coloración con el almidón, cuando se diluya o acidule.

### 3. Ácido sulfúrico concentrado

La concentración de este ácido es aproximadamente 36N por lo tanto 1mL equivale a unos 3mL del reactivo álcali yoduro azida.

### 4. Solución de tiosulfato de sodio 0.025N

- a) Pesar 6.205g de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  disolver en agua destilada recién hervida y enfriada. Diluir a 1 litro.
- b) 1mL equivale a 0.2mg de oxígeno disuelto. Esta solución se puede titular con biyodato ó dicromato.

**Nota:** Es recomendable que las soluciones de tiosulfato se hagan con agua hervida para eliminar el gas carbónico y que se agregue la cantidad mencionada de NaOH con el fin de mantener la solución libre de iones hidrógeno y evitar la descomposición del ión tiosulfato con separación de azufre.



El pH resultante evita también el desarrollo de ciertos microorganismos (*Thiobacillus*) que aceleran la descomposición en el sentido ya dicho.

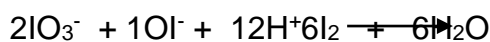
En las soluciones de tiosulfato se acelera la descomposición cuando son expuestas a la luz y por esto se recomienda conservarlas en frascos oscuros o en claros evitando la exposición constante a la acción de la luz.



## Titulación del tiosulfato de sodio

### 1. Solución valorada de Biyodato de potasio 0.025N

El yodo liberado es químicamente equivalente al agente oxidante que se usó:



- Pesar 2g de KI
- Diluir con 150mL de agua destilada
- Agregar solución (1 + 9) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado + H<sub>2</sub>O destilada
- Agregar 20mL de solución K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.025N (Usar pipeta volumétrica)
- Mezclar sin agitar y dejar en obscuridad durante 5 minutos.
- Titular con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> usar almidón como indicador (El vire es a incoloro)

### Cálculos

$$N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \frac{(x)(0.025N)}{\text{mL gastados de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$$

$$X = 20\text{mL de K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$$

### 2. Solución valorada de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

Una solución equivalente al tiosulfato de sodio 0.025N contiene 1.226 g/L de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.

- Secar el K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> previamente a 103°C durante 2 horas. La solución se debe preparar en matraz aforado.
- En matraz Erlenmeyer de 500 mL disolver en 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada 3g de NaI (libre de yodato) y 3g NaHCO<sub>3</sub>
- Cuando las sales se han disuelto agregue cuidado de no agitar mucho el matraz 5-6mL de HCl concentrado.



- d) Después de agregar exactamente 20 mL de la solución valorada de  $K_2Cr_2O_7$  tapar el matraz con un vidrio de reloj y dejar en reposo en obscuridad durante 10 minutos y titular con el tiosulfato 0.025N.

El dicromato de potasio es reducido por el yoduro de potasio en solución ácida según la ecuación:



### Normalidad del tiosulfato

$$N Na_2S_2O_3 = \frac{(x)(0.025N)}{mL \text{ gastados } Na_2S_2O_3}$$

Donde:

x: 20 mL de  $K_2Cr_2O_7$

### NOTA:

Este método, aunque es cómodo, presenta ciertos inconvenientes: la solución de sal crómica es verde y este color impide, cuando no se tiene alguna práctica, ver con facilidad el final de la reacción, o sea la decoloración del engrudo del almidón; por otra parte, el ácido yodhídrico formado por la acción del yodo y el ácido clorhídrico, se oxida con facilidad por el oxígeno del aire en presencia de sales crómicas; esa oxidación libera yodo y los resultados son altos; puede evitar por lo menos en partes, la oxidación del ácido yodhídrico, generando dentro del matraz una atmósfera de  $CO_2$ , para lo cual basta con agregar una pequeña cantidad de bicarbonato de sodio.

## 5. Solución de almidón (indicador)

- a) En un mortero se prepara una emulsión de 5.6g de almidón grado analítico con una pequeña cantidad de agua destilada.



Verter esta emulsión a 1 litro de agua destilada en ebullición, continuar hirviendo unos minutos y dejar sedimentar por una noche.

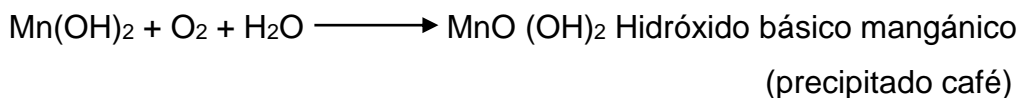
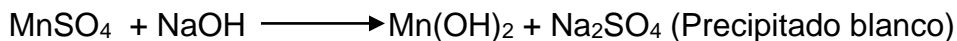
Emplee el líquido claro del sobrenadante, para su preservación se le adiciona 1.25g de ácido salicílico por litro o unas gotas de tolueno (Conservación en refrigeración).

### 9.3.3 Procedimiento para la determinación de oxígeno disuelto

1. Para fijar el oxígeno se adicionan a la botella de DBO conteniendo la muestra, 2 mL de  $MnSO_4$  con una pipeta graduada. Cuidando que la punta de la misma penetre aproximadamente 0.5cm en el seno del agua.

2. A continuación agregar 2mL del reactivo álcali yoduro, la adición se hace en la misma forma que el reactivo anterior; al hacer esta adición se forma un precipitado café si hay oxígeno disuelto, en el caso contrario el precipitado será blanco.

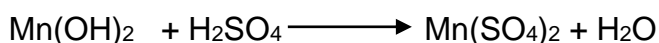
Las reacciones que se llevan a cabo en este paso, son las siguientes:



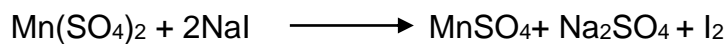
3. Una vez agregado el álcali-yoduro se tapa la botella de DBO rápidamente y se agita vigorosamente durante 30s después de lo cual sedimenta el precipitado.

4. Finalmente se adicionan 2mL de  $[H_2SO_4]$  y se agita hasta la dilución total del precipitado con esto el oxígeno disuelto queda fijado.

Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:

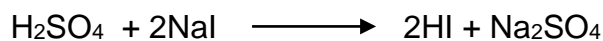




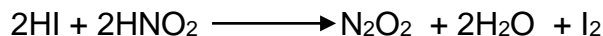


Existe un gran número de interferencias a este método, todo tipo de agentes oxidantes o reductores, iones nitrato, iones ferrosos y materia orgánica.

Se han desarrollado varias modificaciones al método Winkler original con el fin de eliminar o compensar las interferencias. Por lo general todas las aguas contienen compuestos nitrogenados, los cuales alteran los resultados, efectuándose las siguientes reacciones:



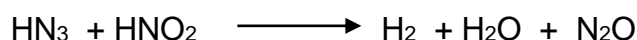
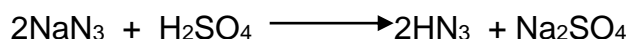
Entonces,



Esta liberación de yodo nos altera el valor, dándonos resultados falsos. Para evitar el error anterior se usa la modificación de la azida al método de Winkler.

Esta modificación, consiste en agregar azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) al reactivo álcali-yoduro, para formar el álcali-yoduro-nitruro.

La azida nos impide la interferencia de los compuestos nitrogenados de la siguiente forma:



La titulación se efectúa con tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0.025N, usando una solución de almidón como indicador.



## Cálculos

$$OD (ppm) = \frac{Tiosulfato (mL) \times N \times Eq. \times 1000}{Vol. muestra(mL)}$$

### Donde:

N: Normalidad de tiosulfato

Eq: Peso equivalente de oxígeno

### Corrección por la adición de reactivos

Reactivos agregados = 4mL (2mL de sulfato manganoso + 2mL de álcali-yoduro-nitruro) en 300mL de muestra original.

Si se pipetea 100mL de muestra

$$\frac{300}{300 - 4} = \frac{100}{x}$$

$$x = 98.7mL$$

### Sustituyendo y rectificando el volumen de muestra

$$OD (ppm) = \frac{Tiosulfato (mL) \times 0.025 \times 8 \times 1000}{98.7}$$

$$Factor cte. = \frac{0.025 \times 8 \times 1000}{98.7}$$



***Factor cte. = 2.03***

***OD (ppm) = Tiosulfato (mL) x 2.03***



#### 9.4 Anexo D. Concentración de lindano y análisis de metabolitos por GC/MS (Quintero *et al.*, 2005)

El procedimiento para la extracción de metabolitos intermediarios de la degradación de lindano fue desarrollado como se explica enseguida:

- i. Se tomaron alícuotas de 3 mL (homogenizar antes de tomar la muestra), fueron transferidas a tubos volumétricos de 15 ml, se mezclaron con 6 ml de una solución hexano-acetona (1:1)
- ii. Los tubos fueron herméticamente sellados y agitados por 10 minutos en un vortex con la finalidad de lograr el transporte del lindano y sus metabolitos del líquido o del suelo a la fase orgánica, se centrifugó (2500 rpm durante 10 minutos) para la separación de la fase orgánica y acuosa.
- iii. Se tomó una alícuota de la fase orgánica para análisis por GC/MS

##### • Características del cromatógrafo

El lindano residual y los metabolitos intermediarios extraídos del suelo o de la fase acuosa, fueron analizados en un Varian-Saturn GC/MS (CP 3900), equipado con puerto de inyección split-splitless, inyector automático y conectado a un espectrómetro de masas con trampa de iones. La columna capilar utilizada fue una CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS fused silica WCOT (30m y 0.25 de mm ID). La temperatura se programó de la siguiente manera: 35 °C durante 6 minutos, después se aumentó a una razón de 3°C/min hasta 180 y después a una razón de 8 °C/min hasta 270 °C. Las temperaturas correspondientes a la línea de transferencia y a la trampa de iones fue de 280 °C y 220 °C respectivamente y la energía de ionización fue de 70 eV. El volumen de inyección fue de 1 µL a través de inyección splitless a 280 °C. El gas acarreador utilizado fue Helio con un flujo de 1mL/min.

## 9.5 Anexo E. Productividad

### 9.5.1 Artículos en revistas indexadas

*Journal of New Materials for Electrochemical Systems 16, 217-228 (2013)*  
© J. New Mat. Electrochem. Systems

#### Preformance of an Electrobiochemical Slurry Reactor for the Treatment of a Soil Contaminated with Lindane

Beni Camacho-Pérez<sup>1</sup>, Elvira Ríos-Leal<sup>2</sup>, Omar Solorza-Feria<sup>3</sup>, Pedro Alberto Vazquez-Landaverde<sup>4</sup>, Josefina Barrera-Cortés<sup>5</sup>, María Teresa Ponce-Noyola<sup>6</sup>, Jaime Garcia-Mena<sup>7</sup>, Noemi Rinderknecht-Seijas<sup>8</sup>, and Héctor Mario Poggi-Varaldo<sup>1,\*</sup>

Journal of Environmental Management 95 (2012) S306–S318



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Environmental Management

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jenvman](http://www.elsevier.com/locate/jenvman)



#### Review

#### Enzymes involved in the biodegradation of hexachlorocyclohexane: A mini review

Beni Camacho-Pérez<sup>a</sup>, Elvira Ríos-Leal<sup>b</sup>, Noemí Rinderknecht-Seijas<sup>c</sup>, Héctor M. Poggi-Varaldo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Environmental Biotechnology and Renewable Energies R&D Group, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, P.O.Box 14-740, México D.F., 07000, México

<sup>b</sup> Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN., Central Analítica, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, México D.F., 07000, México

<sup>c</sup> ESIQIE del IPN, División de Ciencias Básicas, Campus Zacatenco, México D.F., México

### 9.5.2 Reconocimiento

“Best Student Paper Award” on Second International Symposium on Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies 2013, Jacksonville, Florida. Battelle Memorial Institute.



### 9.5.3 Abstracts publicados en revistas indexadas

**Camacho-Pérez, B.**; Ríos-Leal, E.; Vazquez-Landaverde, P.A.; García-Mena, J.; Barrera-Cortés, J.; Fava, F.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Bioslurry treatment of a clayish soil polluted with lindane by sequential methanogenic sulfate reducing bioreactors. **Environmental Engineering and Management Journal**, 11 (13), S16

**Camacho-Pérez, B.**; Ríos-Leal, E.; Barrera-Cortés, J.; Esparza-García, F.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Treatment of Soils Contaminated with  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane in Sequential Methanogenic-Aerobic Slurry Bioreactors. **Journal of Biotechnology**, 150S, 559-561.

**Camacho-Pérez, B.**; Ríos-Leal, E.; Esparza-García, F.; Barrera-Cortés, J.; Fava, F.; Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Bioremediation of an Agricultural Soil Polluted with Lindane in Triphasic, Sequential Methanogenic-Sulfate Reducing Slurry Bioreactors. **Journal of Biotechnology**, 150S, 561-562.

### 9.5.4 Capítulos en libros

**Camacho-Pérez, B.**; Poggi-Varaldo, H.M.; Ríos-Leal, E.; Solorza-Feria, O.; Ponce-Noyola, M.T.; García-Mena, J.; Barrera-Cortés, J.; Rinderknecht-Seijas, N. (2013). A novel electrobiochemical slurry reactor and conventional bioslurry reactors for sustainable remediation of lindane polluted soil. R.R. Sirabian and R. Darlington (Editors) *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies 2013*, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. ISBN 978-0-9819730-7-4.

Varo-Argüello, W.E.; **Camacho-Pérez, B.**; Poggi-Varaldo, H.M.; Ríos-Leal, E.; Ponce-Noyola, M.T.; Rinderknecht-Seijas, N. (2013). Simultaneous CO<sub>2</sub> and SO<sub>4</sub><sup>=</sup> electron acceptors in slurry bioreactors for the bioremediation of soil polluted with lindane. R.R. Sirabian and R. Darlington (Editors) *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies 2013*, Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. ISBN 978-0-9819730-7-4.



Varo-Arguello, W.E.; **Camacho-Pérez, B.**; Ríos-Leal, E.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Aerobic degradation of lindane in clay soil with high organic matter content in a triphasic slurry bioreactor. T.C. Fox and H.V. Rectanus (Editors). Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds 2012. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. ISBN 978-0-9819730-5-0

**Camacho-Pérez, B.**; E. Ríos-Leal, E.; Poggi-Varaldo, H.M.; Rinderknecht-Seijas, N. (2011). Desorption Enhancement and Biostimulation in the Bioremediation of a Heavy Agricultural Soil Polluted with Lindane in Sequential Slurry Bioreactors. H.V. Rectanus and R. Sirabian (Editors), Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies—2011. , Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. ISBN 978-0-9819730-4-3

**Camacho-Pérez, B.**; Ríos-Leal, E.; Rinderknecht-Seijas, N.; García Mena, J.; Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Capítulo 8. Biorremediación de suelos pesados contaminados y producción simultánea de metano con reactores de suelos activados metanogénico y secuenciales. *En*: Ríos-Leal, E.; Solorza-Feria, O.; Poggi-Varaldo, H.M. (Editores). Energías Renovables Biológicas—Hidrógeno - Pilas de combustible- II. pp 118-132. Ed. CINVESTAV, México D.F., México. ISBN 978-607-00-3608-8

#### 9.5.5 Publicaciones en extenso en congresos internacionales

**Camacho-Pérez, B.**; Solorza-Feria, O.; Ríos-Leal, E.; Vazquez-Larios, P.A.; Ponce-Noyola, M.T.; García-Mena, J.; Rinderknecht-Seijas, N.; Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Remediation of a soil contaminated with lindane in an electrobiochemical slurry reactor. **9<sup>th</sup> International Symposium on New Materials and Nano-Materials for Electrochemical Systems. XII International Congress of the Mexican Hydrogen Society. Mérida, México, 2012.**

**Camacho-Pérez, B.**; Ríos-Leal, E.; Esparza-García, F.; Barrera-Cortés, J.; Fava, F.; Poggi-Varaldo, H.M. (2010). Removal of lindane in sequential slurry reactors with addition of silicone oil. **12<sup>th</sup> World Congress on Anaerobic Digestion. October 31<sup>st</sup> – November 4<sup>th</sup>, 2010. International Water Association. Anaerobic Digestion Group. Guadalajara, México**