

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

---

TÍTULO DEL TRABAJO:  
**ARRANQUE Y OPERACIÓN DE UN REACTOR GENERADOR DE INÓCULO  
AEROBIO ACLIMATADO A LINDANO PARA EVALUACIÓN DE PRUEBAS  
DE DEGRADACIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON AGROQUÍMICOS**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERA AMBIENTAL

PRESENTA:  
**PÁEZ GONZÁLEZ NORMA KARINA**

DIRECTOR EXTERNO: Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo

DIRECTOR INTERNO: Dr. Enrique Durán-Páramo

México, D. F. Mayo de 2006

**Este trabajo se realizó en el lab-33 del grupo de Biotecnología Ambiental del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección del Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo.**

*Para un ángel que siempre creyó en mí,, que me apoyó toda mi vida, que nunca me dio la espalda, que siempre me escuchó, para ese ángel que me hizo reír, llorar, cantar y entender que la vida es muy bella si tienes a gente que te ama. Gracias papá... TE AMO GORDO. Te mando besos en donde quiera que estés.*

*Para una mujer excepcional, que ha sido un ejemplo como mujer, mamá, hermana, amiga. Para la mujer que nunca se ha dejado vencer y que siempre ha visto por su familia, gracias ma, esto solo es un poquito de lo que he aprendido de tí y de mí papá. TE AMO.*

*Para ustedes que siempre me han cuidado y que a pesar de que no me esperaban, me aceptaron con mucho amor, gracias por enseñarme a ser una hija agradecida y una hermana que no se rinde. Gracias hermanos por echarme porras y gracias Lili por confiar en mí. Los AMO.*

*Mis niños hermosos, los adoro y esto es solo un ejemplo de lo que estoy segura que van a lograr, espero que siempre sea un ejemplo para ustedes y saben que siempre les ayudaré. Los adoro mis chamacos latosos. Los amo Montse y Balaam.*

*Por las personas que me encontré en estos años, que me apoyaron cuando más lo necesité y por el lazo tan especial que nació entre nosotros “los mutantes”.*

*MOR, sabes que tengo muchas cosas que agradecerte, entre las cuales es el de apoyarme, cuidarme, mimarme, quererme y sobre todo ayudarme en estos últimos meses, no importa el tiempo sabes que te adoro y que TE AMO.*



# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
NOTACIÓN .....	iv
1 RESUMEN .....	1
2 INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 Contaminación de los suelos en México .....	2
2.2 Compuestos organoclorados .....	4
2.3 Antecedentes (lindano y métodos de restauración de suelos) .....	5
2.4 Lindano .....	5
2.5 Métodos de remediación de suelos .....	7
2.6 Antecedentes de la degradación del lindano .....	9
2.7 Fundamento de la biodegradación del lindano .....	11
2.8 Biorremediación de suelos .....	13
2.9 Reactores de Suelos Activados .....	15
2.10 Requerimientos microbiológicos .....	16
3 JUSTIFICACIÓN .....	18
4 HIPÓTESIS .....	18
5 OBJETIVOS .....	18
5.1 Objetivo general .....	18
5.2 Objetivos Específicos .....	18
6 METODOLOGÍA .....	19
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
8 CONCLUSIONES .....	34
9 RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO .....	35
10 REFERENCIAS .....	36
ANEXO A: Métodos fisicoquímicos .....	39
ANEXO B: Métodos microbiológicos .....	44
ANEXO C: Metodología para los RSA .....	47

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de residuos peligrosos que se encuentran como principales contaminantes en sitios abandonados y/o ilegales en varios Estados de México .....	3
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas .....	4
Tabla 3. Propiedades químicas del lindano .....	7
Tabla 4. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación clasificadas de acuerdo al tipo de tratamiento .....	9
Tabla 5. Microorganismos degradadores de lindano .....	10
Tabla 6. Ventajas y desventajas de las tecnologías en remediación <i>in-situ</i> , <i>ex-situ</i> y <i>ad-situ</i> .....	15
Tabla 7. Tabla de seguimiento y análisis para el RGIA .....	19
Tabla 8. Tabla de seguimiento y análisis para los RSA .....	20
Tabla 9. Descripción de la aclimatación del inóculo generado en el reactor .....	21
Tabla 10. Composición del agua de alimentación aerobia (AAA) .....	22
Tabla 11. Morfología colonial de bacterias detectadas en el RGIA .....	27
Tabla 12. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos registrados por etapa en el RGIA .....	29
Tabla 13. Composición del medio mineral en los RSA .....	30
Tabla 14. Descripción de las unidades experimentales .....	30

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a la PROFEPA entre 1997 y 1999 .....	2
Figura 2. Estructura del lindano .....	5
Figura 3. Degradación aerobia de lindano .....	12
Figura 4. Descripción del proceso de los RSA a nivel industrial .....	15
Figura 5. Imagen del RGIA montado en laboratorio .....	22
Figura 6. Remoción de lindano en el RGIA .....	23
Figura 7. Remoción de la DQO en el RGIA .....	24
Figura 8. Concentración de biomasa en el RGIA .....	24
Figura 9. Concentración de cloruros en el RGIA .....	25
Figura 10. Valores de pH registrados en el RGIA.....	26
Figura 11. Unidades Formadoras de Colonias por litro (UFC/L) que se detectaron en el RGIA .....	27
Figura 12. Bacterias totales detectadas en el RGIA .....	28
Figura 13. Bacterias lindanolíticas detectadas en el RGIA .....	28
Figura 14. Remoción de lindano en los RSA .....	31
Figura 15. Remoción de la DQO en los RSA .....	32
Figura 16. Incremento en la concentración de cloruros en los RSA .....	32
Figura 17. Valores de pH registrados en los RSA .....	33

# NOTACIÓN

AAA	Agua de alimentación aerobia
CAA	Control abiótico para el sistema de suelos activados
CBA	Control biótico para el sistema de suelos activados
CBL	Cuenta de bacterias lindanolíticas generadas en el reactor generador del inóculo
Cl <sup>-</sup>	Cloruros
CTB	Cuenta total de bacterias generadas en el reactor generador del inóculo
DQO	Demanda química de oxígeno
RGIA	Reactor generador de inóculo aerobio
RSA	Reactores de suelos activados
RSAs	Unidades experimentales con sacarosa para el sistema de suelos activados
RSAs	Unidades experimentales sin sacarosa para el sistema de suelos activados
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
UFC	Unidad formadora de colonias
Caracteres Griegos	
$\Delta$ Cl <sup>-</sup>	Incremento neto de cloruros en el efluente
$\eta$ DQO	Remoción de la demanda química de oxígeno



## 1 RESUMEN

El presente estudio reporta los resultados obtenidos durante el trabajo experimental de investigación que tuvo por objetivo el generar un inóculo aerobio que fuese capaz de degradar al lindano y utilizarlo para evaluar la remoción del contaminante en un suelo agrícola contaminado. El desarrollo experimental se realizó en tres fases, la primera fue la de operar y arrancar un reactor generador de inóculo aerobio (RGIA) y aclimatarlo a lindano. Esto se llevó a cabo en tres etapas: 1) Etapa A la concentración del contaminante fue de 3 mg/L con un tiempo de operación de 48 días, 2) Etapa B se aumentó la concentración a 5 mg/L y se operó 84 días y 3) Etapa C con una concentración de 7mg/L y con un tiempo de operación de 81 días. La segunda fase fue el monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el RGIA (pH, cloruros, demanda química de oxígeno y remoción de lindano) y microbiológicos (Cuenta total de bacterias y cuenta de bacterias lindanolíticas), la última fase del proyecto fue la de realizar una evaluación de degradación de lindano en reactores de suelos activados (RSA) en ambiente aerobio utilizando un suelo franco-arcilloso. Esta última fase se realizó durante 30 días (se hizo el monitoreo de pH, cloruros, DQO y remoción de lindano en el sobrenadante). Se manejaron dos unidades experimentales: con sacarosa (RSAcs) y sin sacarosa (RSAss), y dos controles: biótico (CBA) y abiótico (CAA).

De acuerdo a los resultados obtenidos de las fases que se realizaron a lo largo del desarrollo experimental y a los objetivos planteados al inicio de esta investigación, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- El porcentaje de remoción del lindano promedio en el RGIA durante las dos primeras etapas fue del 40% y 36% respectivamente, mientras que en la etapa C aumentó hasta un 54% en promedio.
- Por morfología se detectó la presencia de tres bacterias (A, B y T) en el RGIA, de las cuales solo dos son lindanolíticas (B y T).
- La remoción de la DQO fue del 80% en promedio durante las tres etapas.
- La biomasa presentó una disminución en la concentración al inicio de cada etapa de aclimatación debido probablemente al efecto tóxico del lindano, aunque después se recupera aumentando la concentración.
- Se obtuvo un inóculo aerobio capaz de degradar al lindano.
- La mayor remoción de lindano que se obtuvo en los sistemas de suelos activados fue la unidad experimental sin sustrato (RSAss), con una remoción del 86.1%.
- La RSAss registró una remoción de la DQO de 78.4%.
- La adición de co-sustrato sacarosa tiene un efecto benéfico significativo sobre la remoción de lindano, mas no sobre la DQO.

## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 Contaminación de los suelos en México

Como consecuencia de varios siglos de actividades antropogénicas, en nuestro País, se han incrementando el establecimiento de diversos tipos de industrias, los procesos que maneja cada industria generan residuos, que en su mayoría no reciben tratamiento alguno. Lo que ha provocado que a través del tiempo la contaminación por estos residuos se disperse en el ambiente, ésta se da por diversas vías: derrames, emisiones mal controladas, fugas, confinamientos irregulares, etc.

En los últimos años la cantidad de sitios que se encuentran reportados como contaminados por residuos peligrosos han aumentado considerablemente, según la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), cada año se presentan en México en promedio 550 emergencias ambientales asociadas con materiales y residuos peligrosos, la figura 1 muestra las principales sustancias involucradas en las emergencias ambientales reportadas en nuestro País.

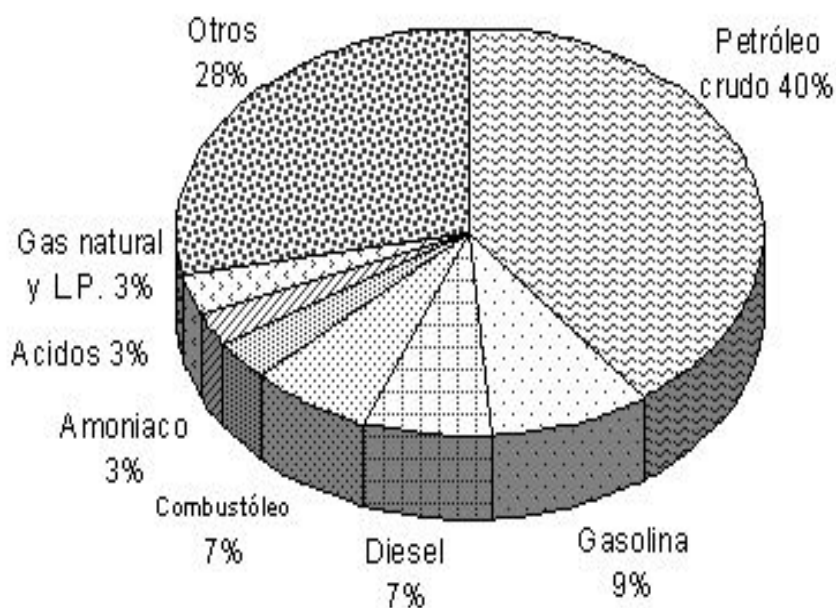


Figura 1. . Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a la PROFEPA entre 1997 y 1999 (PROFEPA, 2002).

Como se mencionó, en todo el País existen problemas de contaminación originados por diversas fuentes, que aún no son cuantificados con precisión. 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); derrames 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-SEMARNAP, 1997). En la tabla 1 se enlistan algunos sitios contaminados que se encuentran en nuestro País.

Tabla1. Tipos de residuos peligrosos que se encuentran como principales contaminantes en sitios abandonados y/o ilegales en varios Estados de México (PROFEPA, Informe Trianual 1995 -1997, 1998).

Estado	Número de sitios	Principales residuos
B.C. Norte	8	Aceites, metales, polvo de fundición, solventes
B.C. Sur	2	Escorias de fundición, jales
Campeche	4	Aceites, lodos de perforación
Chiapas	17	Hidrocarburos, plaguicidas, solventes
Chihuahua	13	Aceites, hidrocarburos, químicos
Coahuila	15	Aceites, hidrocarburos, jales, metales, químicos
Durango	3	Hidrocarburos, insecticidas
Estado de México	10	Aceites, escorias de fundición, químicos
Guanajuato	10	Aceites, escorias de fundición, lodos, metales, compuestos organoclorados
Hidalgo	6	Escorias de fundición, pinturas
Jalisco	7	Diesel y combustible, baterías, lodos, químicos
Nayarit	5	Hidrocarburos, jales
Nuevo León	22	Aceites, cianuros, escorias de fundición, hidrocarburos, metales
San Luis Potosí	10	Asbesto, escorias de fundición, lodos, metales, pinturas
Sinaloa	4	Agroquímicos
Tamaulipas	8	Aceites, escorias de fundición, químicos
Veracruz	8	Azufre, hidrocarburos
Zacatecas	9	Jales, metales, químicos

Una de las principales fuentes de contaminación de suelos en nuestro País, como se ha mencionado, es la industria de los agroquímicos. El uso excesivo de agroquímicos, así como el inadecuado manejo y disposición de sus envases y residuos, es un problema generalizado en México.

Muchos de los plaguicidas empleados en el País, 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 haya incrementado en más de seis veces (CICOPLAFEST, 2000).




Los plaguicidas son el nombre genérico que recibe cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se utiliza para controlar plagas que atacan los cultivos o insectos que son vectores de enfermedades.

La clasificación de los plaguicidas puede variar, ésta dependerá de sus características físicas, químicas, por los organismos a los que controlan o por su peligrosidad (Ver tabla2). Según su composición química se clasifican en: insecticidas (organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos), herbicidas

(dinitrofenoles y triazinas) y fungicidas (fenoles y compuestos de cobre y azufre) (CICOPLAFEST, 1996).

Todas estas sustancias son compuestos químicos tóxicos y por su aplicación en tierras de cultivo, evidentemente son compuestos que se encuentran como contaminantes de grandes extensiones de suelos en todo el País, por lo que se deben dar alternativas para controlar su uso, manejo, disposición y su remoción de lugares naturales donde estén ocasionando problemas (ambientales y/o de salud).

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según la NOM-045-SSA1-1993.

Clasificación según su riesgo	Clasificación del peligro	Pictográfico	Color de la banda	Leyenda
CLASE Ia	Extremadamente peligroso		ROJO	MUY TÓXICO
CLASEA Ib	Altamente peligroso		ROJO	TÓXICO
CLASE II	Moderadamente peligroso		AMARILLO	NOCIVO
CLASE III	Ligeramente peligroso	-----	AZUL	CUIDADO
CLASE IV	Productos que normalmente no ofrecen peligro		VERDE	CUIDADO

## 2.2 Compuestos organoclorados

Los plaguicidas organoclorados son eficaces contra una gran variedad de insectos, y se dispersan en el ambiente a partir de la acumulación de desechos contaminados en los vertederos de basura, de la polución causada por los incineradores de basura y de la liberación de gases en las fábricas donde son producidos.

Debido a que los compuestos organoclorados son liposolubles, se encuentran en mayores concentraciones en alimentos con un alto contenido en material graso. Y además son catalogados como compuestos orgánicos persistentes (COP's). Los plaguicidas organoclorados son químicos resistentes a la degradación fotolítica, biológica y química. Las propiedades tóxicas de estas sustancias perduran durante largo tiempo en el ambiente y pueden recorrer grandes distancias antes de



almacenarse en los tejidos grasos. Estos contaminantes se distinguen por ser semivolátiles, lo que les permite presentarse en forma de vapor o ser adsorbidos sobre partículas atmosféricas, facilitando así su transporte a grandes distancias en la atmósfera, a través del aire, el agua o algunas especies migratorias (Ritter *et al.*, 1995).

Los organoclorados tienen una larga vida media biológica, facilitando de esta manera la acumulación de concentraciones unitarias aparentemente pequeñas durante períodos prolongados de tiempo (bioacumulación).

### 2.3 Antecedentes (lindano y métodos de restauración de suelos)

En nuestro País se ha restringido e incluso se ha llegado a prohibir el uso de plaguicidas clorados, esto por las afectaciones medioambientales y de salud que se han reportado. Una de estas sustancias es el lindano.

### 2.4 Lindano

El lindano es un organoclorado que se aplicó como insecticida en los cultivos de caña de azúcar, tabaco y muchos otros. En México está prohibida su venta y su uso agrícola, pero se sigue utilizando en preparados para el tratamiento de ácaros en ganado (INE, 2004).

El lindano es el isómero 99.5% gamma de los HCH, o  $\gamma$ -HCH, único isómero activo factible de uso como plaguicida.

El lindano es un sólido, que es poco soluble en agua y muy soluble en solventes orgánicos, tal como la acetona y en solventes aromáticos.

El lindano puede ser separado o detectado del resto de sus isómeros por diversos métodos como extracción líquido/líquido, cromatografía en columna y cromatografía de gases con captura de electrón.

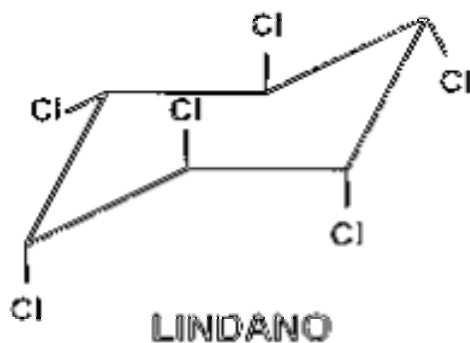


Figura 2. Estructura del lindano (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente).

El lindano es adsorbido en suelos que contienen una gran cantidad de materia orgánica; este puede transportarse hasta sitios que son muy húmedos o tengan una irrigación artificial. Es un compuesto semi-volátil puede tener una importante ruta de dispersión en regiones donde la temperatura es elevada como en las zonas tropicales.

Como todos los organoclorados, el lindano es una molécula muy estable y persistente en el ambiente. Por ser liposoluble, tiende a bioacumularse en los tejidos con mucha grasa, como las glándulas mamarias, el hígado y el sistema nervioso. Esta persistencia en el ambiente y en los mamíferos, es la razón fundamental para que se le haya retirado del comercio en la mayoría de los países. Las propiedades químicas de el lindano se describen en la tabla 3.

En México el lindano se encuentra clasificado como insecticida y acaricida de uso restringido, (CICOFLEST, 1998), además la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-1993 que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente, clasifica al lindano en su anexo 5 tabla 6 como un residuo peligroso, marcando como límite máximo permisible de 0.4mg/L.

Tabla 3. Propiedades químicas del lindano  
(Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente).

<b>Lindano</b>	
Nombre común	Lindano
Nombres comerciales	Agrocide, Aparasin, Arbitex, BBH, Ben-hex, Bentox, Celanex, Chloresene, Dvoran, Dol, Entomoxan, Exagamma, Forlin, Gallogama, Gamaphex, Gammalin, Gammex, Gammexane, Hexa, Hexachloran, Hexaverm, Hexicide, Isotos, Kwell, Lendine, Lentox, Linafor, Lindafor, Lindagam, Lindatox, Lintox, Lorexane, Nexit, Nocochloran, Novigam, Omnitox, Quellada, Silvanol, Tri-6, Vitron
Nombre químico	Isómero gama de 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano o $\gamma$ -hexaclorobenceno
Número CAS	58-89-9
Tipo químico	Hidrocarburo clorado
Peso molecular	564.7g/mol
Aspecto	Sólido cristalino incoloro
Uso	Plaguicida, acaricida
Persistencia en el ambiente	De 2-13 días en el aire De 30-300 días en sistemas acuáticos De 50 días en sedimentos y más de 2 años en suelo

## 2.5 Métodos de remediación de suelos

La búsqueda de soluciones que ayuden a corregir los daños causados por nuestras actividades es constante. En la actualidad existen métodos y técnicas que cumplen con estos objetivos. Las tecnologías de tratamiento implican cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que altera la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2001). Las tecnologías de remediación representan una alternativa a la disposición en tierra de desechos peligrosos que no han sido tratados, y sus capacidades o posibilidades de éxito, bajo las condiciones específicas de un sitio, pueden variar ampliamente.

El uso de una tecnología de remediación en particular depende, además de los factores específicos del sitio y de las propiedades fisicoquímicas del contaminante, de su disponibilidad, de la fiabilidad demostrada o proyectada, de su estado de desarrollo (laboratorio, escala piloto o gran escala) y de su costo (Sellers, 1999).

Los métodos utilizados para la restauración de suelos son: fisicoquímicos, térmicos y biológicos.

Los tratamientos fisicoquímicos utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación, mientras que los térmicos utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo, y los biológicos aprovechan la capacidad de las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos, (INE 2005a).

La tabla 4 muestra las ventajas y desventajas en la utilización de las diversas técnicas de restauración de suelos.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación, clasificadas de acuerdo al tipo de tratamiento (EPA, 2001).

Tipo de tratamiento	Ventajas	Desventajas
<b>Tratamientos biológicos</b>	<p>Son tecnologías más benéficas para el ambiente</p> <p>Los contaminantes generalmente son destruidos</p> <p>Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior</p>	<p>Requieren mayores tiempos de tratamiento</p> <p>Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos</p> <p>No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano</p>
<b>Tratamientos fisicoquímicos</b>	<p>Pueden realizarse en periodos cortos</p> <p>El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería</p>	<p>Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos</p> <p>Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación</p>
<b>Tratamientos térmicos</b>	<p>Permite tiempos rápidos de limpieza</p>	<p>Es el grupo de tratamientos más costoso</p> <p>Los costos aumentan en función del empleo de energía y equipo</p>

## 2.6 Antecedentes de la degradación del lindano

Desde hace más de una década se han venido realizando estudios relacionados con la remoción de compuestos utilizados como agroquímicos, uno de ellos es el lindano, este es muy dañino por lo que su venta y utilización para el control de plagas en los campos de cultivo fueron prohibidos. La vida media del lindano en suelos ha sido calculada aproximadamente de cinco años, a pesar de que su uso y

venta han sido prohibidas hasta hace poco, aún se sabe que se utiliza clandestinamente en Estados Unidos y en México.

Se han realizado diversas investigaciones enfocadas a la remoción de este contaminante (João de Barros, *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 1993). Una de las técnicas aplicadas para este fin es la biorremediación (EPA, 1997; Weber *et al.*, 1994 ), ésta ha demostrado ser eficaz para cumplir con este fin.

Una variedad de experimentos sobre la degradación del lindano fueron perfeccionándose con la mezcla de microorganismos contaminados que se encontraban en diversos tipos de suelos que habían sido expuestos a este contaminante. Algunos ensayos realizados para comprobar la remoción del lindano por medio de microorganismos, arrojaron después de varios años que el factor que ayudaba a la disminución de este contaminante en el suelo era la actividad metabólica de algunos microorganismos, éstos se muestran en la tabla 5.

La degradación del lindano en suelos puede ser en condiciones aerobias (presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno), se debe considerar que dependiendo de la concentración en que este químico se encuentre en el medio, podrá o no actuar como inhibidor de los microorganismos.

Lo anterior quedó demostrado en un trabajo realizado por Nash *et al.* (1973), donde se agregaron 224kg/ha de herbicidas de los cuales 33.6kg correspondían al  $\gamma$ -HCH. Esta concentración rebasaba la capacidad de degradación de los microorganismos presentes en el suelo, ocasionando que la remoción disminuyera.

Tabla 5. Microorganismos degradadores de lindano  
(Tu, 1976; Jagnow *et al.*, 1977).

Bacteria	Hongo	Alga
<i>Artrobacter sp</i>	<i>Pencillium sp.</i>	<i>Chlamydomas sp.</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Chlorella sp.</i>
<i>Citrobacter sp.</i>		
<i>Clostridium sp.</i>		
<i>Enterobacter sp.</i>		
<i>Micromonospora sp.</i>		
<i>Pseudomonas sp.</i>		
<i>Thermoactinomyces sp.</i>		

## 2.7 Fundamento de la biodegradación aerobia

El fundamento bioquímico de la biodegradación se basa en que la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuesto hidrocarbonado) que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia.

Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son: el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como último aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio.

Muchos microorganismos son capaces de utilizar compuestos halogenados como sustrato de crecimiento. En el caso del metabolismo del lindano por cultivos puros, se ha reportado que *Sphingomonas paucimobilis* UT26 puede utilizar al  $\gamma$ -HCH como una sola fuente de energía y carbono (Ver figura 3). El  $\gamma$ -HCH es convertido mediante dos rutas de deshidrocloración vía  $\gamma$ -pentaclorociclohexeno ( $\gamma$ -PCCH) a 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno (1,4-TCDN), este compuesto es metabolizado a 2,5-dicloro-3,5-ciclohexadieno-1,4-hidroquinona (2,5-DDOL), por dos etapas de deshalogenación hidrolítica. Posteriormente el 2,5-DDOL es completamente degradado a 2,5-diclorohidroquinona (2,5-DCHQ), y finalmente este último metabolito es mineralizado. También se pueden encontrar como productos finales al 1,2,4-triclorobenceno (1,2,4-TCB) y 2,5-diclorofenol (2,5-DCF). En esta ruta de biodegradación están involucrados varios genes que codifican para diversas enzimas: el gen *linA* codifica para la  $\gamma$ -HCH-deshidroclorinasa (LinA), la cual convierte el  $\gamma$ -HCH a 1,2,4-TCB vía  $\gamma$ -PCCH; el gen *linB* codifica para la 1,4-TCDN clorohidrolasa (LinB), la cual convierte el 1,4-TCDN a 2,5-DDOL vía 2,4,5-tricloro-2,5-ciclohexadieno-1-ol (2,4,5-DNOL); el gen *linC* codifica a la 2,5-DCHQ deshidrogenasa la cual convierte al 2,5-DDOL a 2,5-DCHQ; el gen *linD* codifica para una 2,5-diclorohidroquinona reductiva deshalogenasa que convierte al 2,5-DCHQ a hidroquinona (HQ) vía clorohidroquinona (CHQ) (Nagata *et al.*, 1999; Marek *et al.*, 2000; Miyauchi *et al.*, 2002).

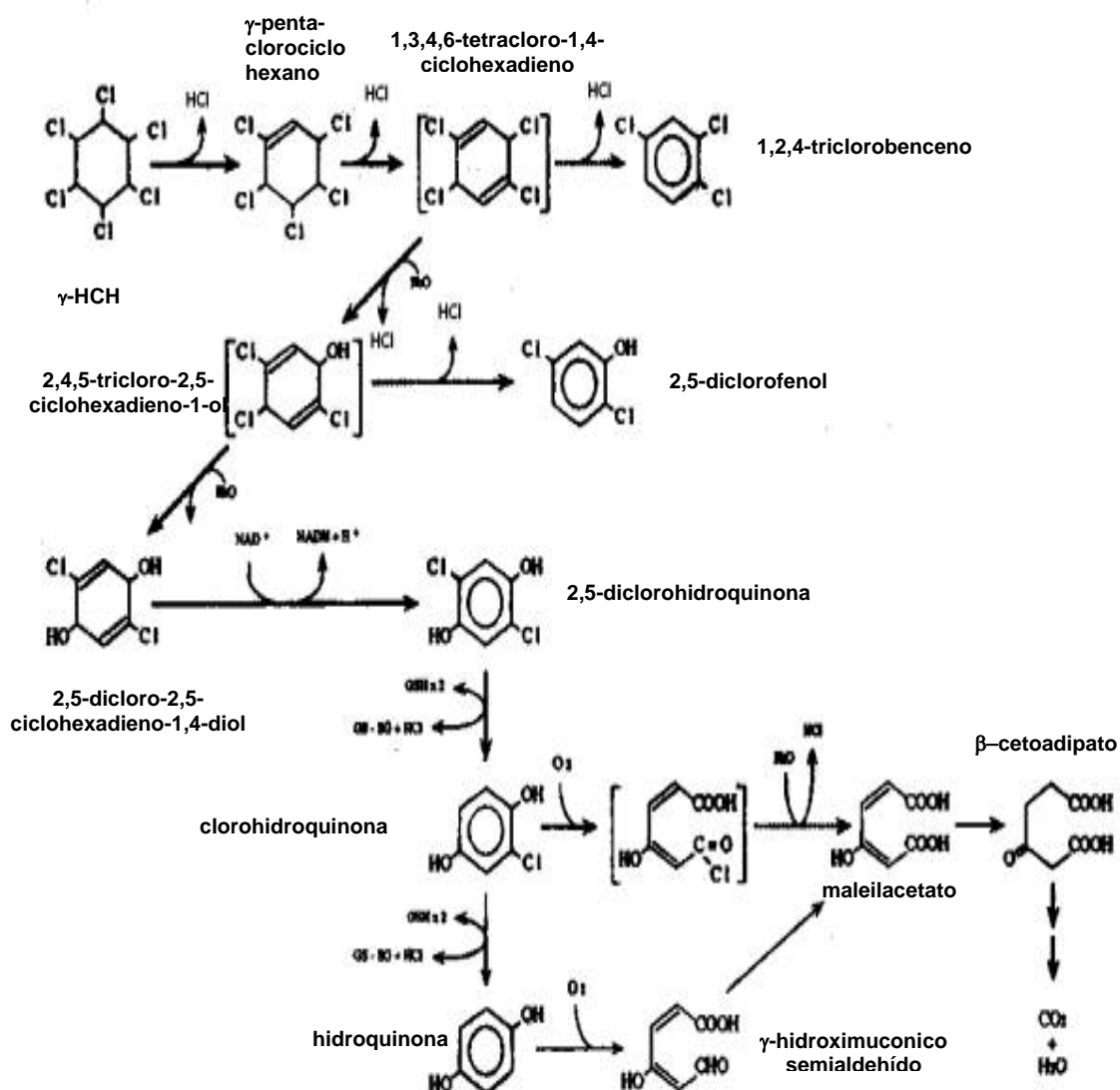


Figura 3. Degradación aerobia del lindano (Miyacuchi *et al.*, 2002).

En estudios de biodegradación realizados en suelos contaminados con lindano, Tu (1975) utilizó tres tipos de suelos (limoso-arenoso, arenoso-limoso y limoso-arcilloso) contaminados con distintas concentraciones de  $\gamma$ -HCH (10, 100 y 1000mg Lindano/kg suelo seco). En este trabajo se observó diferentes productos de degradación como el  $\gamma$ -PCCH,  $\alpha$ -TCCH,  $\gamma$ -TCCH y PCB. La producción de cloruros en suelos contaminados y el incremento en el consumo de oxígeno sugirió que el insecticida estuvo sujeto a degradación microbológica. En suelo arcilloso-limoso contaminado con 1000mg  $\gamma$ -HCH/Kg suelo, la liberación de cloruros fue mayor hasta las 20 semanas de incubación, comparado con el suelo arenoso-limoso a las 18 semanas y el suelo limoso-arenoso que fue a las 14 semanas. El incremento en el consumo de oxígeno fue mayor en los suelos areno-limoso y arcillo-limoso con altas concentraciones de lindano (1000 y 100mg/kg suelo). La población bacteriana y de hongos disminuyó en las primeras semanas de incubación, para después recobrar sus niveles igualando o superando a la de los controles, por lo que se observó un efecto



estimulante del insecticida. Posteriormente, Tu (1976) aisló algunos microorganismos del suelo (géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Arthrobacter*) capaces de oxidar al lindano y utilizarlo como única fuente de carbono en medio líquido, produciendo metabolitos como el  $\gamma$ -2,3,4,5,6-pentacloro-1-ciclohexeno ( $\gamma$ -PCCH),  $\alpha$ -3,4,5,6-tetracloro-ciclohexano ( $\alpha$ -TCCH),  $\beta$ -3,4,5,6-tetracloro-1-ciclohexeno ( $\beta$ -TCCH),  $\gamma$ -2,3,4,5,6-tetracloro-1-ciclohexeno ( $\gamma$ -TCCH) y pentaclorobenceno (PCB), generando cloruros libres y aumentando la velocidad de consumo de oxígeno. Bachman *et al.*, (1988) reportan la biodegradación de  $\alpha$ -HCH en suelo contaminado (400mg  $\alpha$ -HCH/Kg suelo) en un sistema de suelos activados bajo diferentes condiciones de óxido-reducción. Ellos mismos señalan que en un período de 100 días un porcentaje de biomineralización del 90-100% en ambiente aerobio, 85% en ambiente metanogénico y en ambientes sulfato reductor y desnitrificante no se observó bioconversión. Además, en ambiente aerobio se detectaron metabolitos como el 1,4-diclorobenceno, 1,3-diclorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno, tetraclorobenceno, en ambiente metanogénico el monoclorobenceno (MCB), 3,5-diclorofenol y 2,4,5 triclorofenol, 1,4-diclorobenceno (DCB). También Bachman *et al.*, (1988) trabajando con reactores de suelos activados en ambiente aerobio  $\alpha$ -HCH reporta un 90-100% en 42 días, y también observaron un mayor efecto represivo en la biodegradación de  $\alpha$ -HCH por la adición de acetato (2.2g/L) que por glucosa (2.52g/L). Aunque el  $\alpha$ -HCH es un compuesto más recalcitrante que el  $\gamma$ -HCH, este último es el que tiene interés industrial y agrícola puesto que es el único de los isómeros que tiene efecto insecticida, además, ellos trabajaron con un suelo con 60 % de arena, lo cual lo hace posible que sea aplicado otro tipo de tecnología de biorremediación.

## 2.8 Biorremediación de suelos

Sabiendo de la existencia de microorganismos que son capaces de metabolizar a contaminantes recalcitrantes y que representan un peligro, en México se ha abierto un campo en la investigación que está enfocado a la restauración de suelos por técnicas que sean eficientes y económicas para su ejercicio. Una opción es la biorremediación que se define como un proceso en el que se requiere la utilización de microorganismos vivos, para la remoción casi total de uno o varios contaminantes presentes en el suelo, principalmente de bacterias y hongos, y entre ellos las bacterias han sido principalmente empleadas para la disminución de la toxicidad de los contaminantes, (Rodríguez *et al.*, 1998).

Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos, varían en función de la estructura química del contaminante y de las especies microbianas degradadoras. El proceso de biorremediación incluye reacciones de oxido-reducción,



procesos de desorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales, (Eweis *et al.*, 1998).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in-situ*, *ex-situ* o *ad-situ*, en condiciones aerobias o anaerobias. Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación. La biorremediación *in-situ* está definida como un tratamiento de uno o varios contaminantes sin que el suelo contaminado sea removido. Este tipo de tecnologías usualmente no requieren de la excavación del suelo afectado, la aplicación de la biorremediación *in-situ*, dependerá del lugar, de su acceso, de la gravedad de la contaminación y de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes que se deseen remover (INE 2005a). Cuando el lugar de interés no pueda tratarse en campo, se puede recurrir a la biorremediación *ex-situ* o *ad-situ*. La realización de este tipo de tecnologías, requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio (*ad-situ*) o fuera de él (*ex-situ*) (INE 2005b).

La biorremediación puede apoyarse en la bioestimulación, la cual implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in-situ* (Van Deuren *et al.*, 1997); y la bioaumentación, se usa cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Riser-Roberts, 1998).

La tabla 6 presenta las ventajas y desventajas para la aplicación de la biorremediación *in-situ*, *ex-situ* y *ad-situ*.



Tabla 6. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación *in-situ*, *ex-situ* y *ad-situ* (INE, 2002 ).

	<i>In-situ</i>	<i>Ex-situ</i> y <i>ad-situ</i>
Ventajas	<p>Permiten tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar</p> <p>Potencial disminución en costos</p>	<p>Menor tiempo de tratamiento</p> <p>Más seguros en cuanto a uniformidad: es posible Homogeneizar y muestrear Periódicamente</p>
Desventajas	<p>Mayores tiempos de tratamiento</p> <p>Pueden ser inseguros en cuanto a uniformidad: heterogeneidad en las características del suelo</p> <p>Dificultad para verificar la eficacia del proceso</p>	<p>Necesidad de excavar el suelo aumento en costos e ingeniería para equipos</p> <p>Debe considerarse la manipulación del material y la posible exposición al Contaminante</p>

## 2.9 Reactores de Suelos Activados

Una técnica de biorremediación consiste en el uso de reactores de suelos activados (RSA) también conocidos como bioslurry reactors. En la biorremediación, la mezcla acuosa que es utilizada en esta técnica es creada combinando el suelo contaminado con agua, y mezclándose en un biorreactor. Un sistema de suelos activados típico a nivel industrial se ilustra en la figura 4.

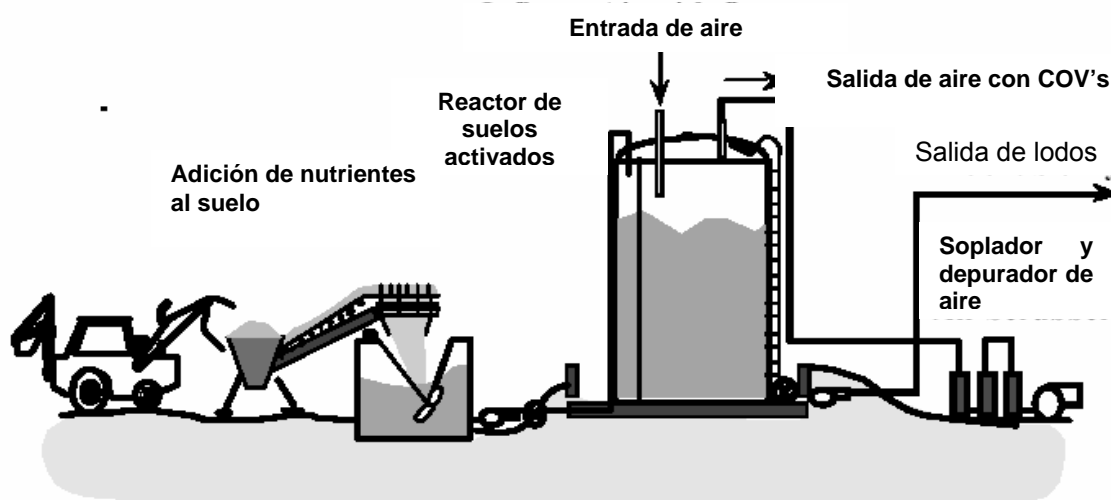


Figura 4. Descripción del proceso de los RSA a nivel industrial ([www.sbrtechnologies.com](http://www.sbrtechnologies.com)).



El suelo primero se selecciona para la eliminación de rocas, ramas, etc. El agua se agrega al suelo caracterizado para hacer una mezcla en un tanque pequeño donde se llevará a cabo el proceso de biorremediación. La concentración de sólidos en un reactor bioslurry se extiende típicamente a partir del 10% al 50% (peso volumen) dependiendo de la concentración del contaminante y de la capacidad del equipo (Ross, 1990; Brox, 1993). En el reactor pueden agregarse nutrientes y otros compuestos que ayuden a la reducción de la concentración del contaminante (microorganismos, surfactantes, etc). La mezcla es entonces transferida al reactor por medio de una bomba. El oxígeno se puede proporcionar por medio de difusores de aire o mezcladores superficiales. El sistema de la aireación se puede diseñar para que esta sea proporcionada mecánicamente mientras es mezclada, o estos dos procesos se pueden realizar con el equipo separado (Cookson, 1995).

Los reactores de suelos activados se cubren y se equipan fácilmente con un sistema para la recuperación de las emisiones. Las emisiones pueden requerir un tratamiento separado antes de la descarga, o pueden ser reincorporados nuevamente al reactor para la biodegradación de la mezcla. Después de que se trate el suelo, los sólidos se separan de la mezcla, el agua es eliminada por las técnicas de desecación (Cookson, 1995). El agua de la mezcla puede requerir tratamiento adicional para quitar contaminantes residuales y/o alimentos antes de la descarga (U. S. EPA, 1990).

El diseño del reactor de suelos activados incluye el tanque mezclador, el puente aéreo, el estrato fluidificado, tambor rotatorio, y lagunas (U. S. EPA, 1990). En el tratamiento de la laguna, la investigación de los sedimentos no se realiza, y la aireación se hace generalmente con los mezcladores superficiales (Anderson, 1995). La operación de los reactores se conduce típicamente en modo de tratamiento por lotes (Jerger *et al.*, 1994; Glaser *et al.*, 1995), pero puede también ser un proceso semicontinuo (Castaldi y Ford, 1992; Stefanoff y Garcia, 1995) o de flujo continuo (Geerdink *et al.*, 1996).

## **2.10 Requerimientos microbiológicos**

Si hablamos de bioestimulación debemos considerar que los microorganismos que estamos utilizando dependen de factores importantes, para su ideal desarrollo. La comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes se encuentra influenciada por los siguientes factores (Maroto y Rogel, 2001).

**Necesidad de nutrientes:** El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y mineralización. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se

encontrasen en el rango normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. El rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.

**pH :** Afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo.

**Temperatura:** Generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 y 45° C (condiciones mesófilicas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40° C e inhibiéndose a inferiores a 0° C.

**Humedad:** Los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los componentes orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. El rango varía en función de la técnica.

**Estructura química del contaminante:** La biodegradabilidad de un contaminante depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica.

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Las actividades antropogénicas han llevado a través del tiempo que nuestro ambiente se deteriore, un ejemplo de ello es la agricultura. El problema que existe en este sector es la utilización de plaguicidas que ayudan a disminuir y/o eliminar plagas que se desarrollan en los plantíos, en su mayoría, estos agroquímicos son compuestos altamente tóxicos, que tienen efectos graves en plantas, animales, agua, suelo, aire y en salud humana.

Debido al incremento de sitios contaminados, se realizan investigaciones que ayuden a la restauración de suelos con técnicas que no afecten al medio ambiente, una de éstas es la biorremediación.

La manipulación de microorganismos para que mineralicen contaminantes tóxicos como el lindano, es una herramienta benéfica para la descontaminación de suelos y no es dañina al medio ambiente.

### **4 HIPÓTESIS**

- El inóculo aerobio generado en reactor a nivel laboratorio, será efectivo para la remoción de lindano en un suelo agrícola contaminado.

### **5 OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo General**

- Arrancar y operar un reactor generador de inóculo aerobio (RGIA) para evaluar la remoción de lindano en reactores de suelos activados a nivel laboratorio.

#### **5.2 Objetivos Específicos**

- Desarrollar inóculo aerobio para el arranque de un Reactor Generador de Inóculo Aerobio (RGIA) a nivel laboratorio.
- Aclimatar el inóculo aerobio a lindano.
- Monitorear los parámetros fisicoquímicos (pH, cloruros, demanda química de oxígeno, sólidos suspendidos volátiles y remoción de lindano) y microbiológicos (Cuenta total de bacterias y de bacterias lindanolíticas) en el RGIA.
- Realizar la evaluación de la remoción de lindano en reactores de suelos activados.



## 6 METODOLOGÍA

La metodología utilizada para el desarrollo de este proyecto consistió en tres fases y se describen a continuación.

### **FASE 1: Arranque y operación del reactor generador de inóculo aerobio (RGIA).**

ACTIVIDAD 1: Montar un reactor aerobio.

ACTIVIDAD 2: Operar el reactor aerobio

### **FASE 2: Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en el RGIA.**

ACTIVIDAD 1: Monitoreo de parámetros fisicoquímicos (pH, DQO, Cl<sup>-</sup>, SSV y remoción de lindano).

ACTIVIDAD 2: Monitoreo de parámetros microbiológicos (Cuenta total de bacterias (CTB) y cuenta de bacterias lindanolíticas (CBL)).

Los métodos empleados para el monitoreo fisicoquímico y microbiológico que se realizaron para el seguimiento del RGIA se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Tabla de seguimiento y análisis para el RGIA.

Parámetro	Alimentación	Efluente	Método <sup>1</sup>
pH	-----	1/día	Método estándar 423
DQO	1/semana	3/semana	Método estándar 508
SSV	1/semana	3/semana	Método estándar 203
Cloruros	1/semana	3/semana	Método estándar 403
Remoción de lindano	-----	3/semana	Cromatografía de gases (Polese <i>et al.</i> , 1996; Zuologa <i>et al.</i> 2000)
Cuenta de Bacterias Lindanolíticas	-----	2/mes	Método estándar 907

<sup>1</sup> Los métodos fisicoquímicos empleados para el desarrollo experimental se encuentran descritos en el Anexo A y los métodos microbiológicos se muestran en el Anexo B.

### FASE 3: Realización de ensayos de degradación de lindano en reactores de suelos activados en ambiente aerobio<sup>2</sup>.

ACTIVIDAD 1: Preparación de las unidades experimentales de los RSA.

ACTIVIDAD 2: Preparación de controles de los RSA.

ACTIVIDAD 3: Seguimiento y análisis fisicoquímico y microbiológicos.

Los métodos para los análisis fisicoquímicos y microbiológicos que se realizaron para el monitoreo en los RSA se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Tabla de seguimiento y análisis para los RSA.

Parámetro	Sobrenadante	Método <sup>3</sup>
pH	7/mes	Método estándar 423
DQO	7/mes	Método estándar 508
Concentración del lindano	7/mes	Cromatografía de gases (Polese <i>et al.</i> , 1996; Zuologa <i>et al.</i> 2000)
Cloruros	7/mes	Método estándar 403

<sup>2</sup> La metodología empleada para el desarrollo experimental de los RSA se describe en el Anexo C.

<sup>3</sup> Los métodos fisicoquímicos empleados para el desarrollo experimental se encuentran descritos en el Anexo A.



## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### FASE 1: Arranque y operación del reactor generador de inóculo aerobio (RGIA).

ACTIVIDAD 1: Montar un reactor aerobio.

Se montó un reactor de biomasa suspendida, con una carga orgánica de 125.57mg/Ldía, con un volumen de operación de 6L. Este reactor fue inoculado con 2L de lodos activados de la planta de San Juan Ixhuaxtepec y con 4L de agua de alimentación sintética.

El flujo de aire se hizo pasar primeramente por una trampa de agua, esto para evitar la entrada de impurezas, y suciedad que pudieran provenir de la tubería de aire, el flujo de entrada de aire es de 7.02L/h. El RGIA se operó a temperatura ambiente.

ACTIVIDAD 2: Operar el reactor aerobio.

El reactor fue purgado y alimentado cada 24 horas, la cantidad de flujo de salida (purga) fue proporcional al de entrada (alimentación) y fue de 0.5L.

La aclimatación del inóculo que se generó en el reactor aerobio, se llevó a cabo en tres etapas y se describen a continuación en la tabla 9.

Tabla 9. Descripción de la aclimatación del inóculo aerobio generado en el reactor.

Etapa	Concentración del contaminante (mg/L)	Carga del contaminante (mgLindano/Ldía)	Tiempo de operación (días)
A	3	0.25	48
B	5	0.41	84
C	7	0.58	81

Los componentes con los que se preparó el agua de alimentación aerobia (AAA), se muestran en la tabla 10. El objetivo del AAA fue la de proveer de nutrientes a los microorganismos y en ésta misma se encontraba el lindano disuelto.

Tabla 10. Composición del agua de alimentación aerobia (AAA).

Componente	Concentración (g/L)	Componente	Concentración (g/L)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.170	Leche en polvo	0.810
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.570	$\text{NH}_4\text{CO}_3$	0.185
$\text{Na}_2\text{PO}_4$	0.660	$\text{MgSO}_4$	0.022
$\text{NaHCO}_3$	0.020	$\text{CaCl}_2$	0.027
$\text{FeCl}_3$	0.002	Lindano (3, 5 y 7 mg/L)	

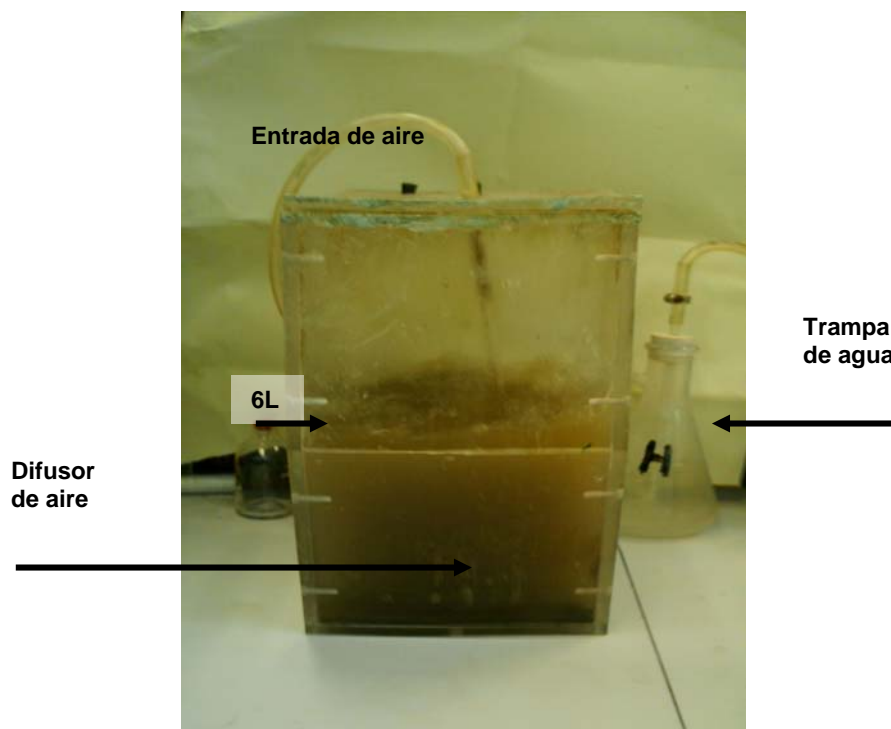


Figura 5. Imagen del RGIA montado en laboratorio.

## FASE 2: Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en el RGIA.

ACTIVIDAD 1: Monitoreo de parámetros fisicoquímicos (pH, DQO,  $\text{Cl}^-$ , SSV y remoción de lindano).

Las figuras que se presentan a continuación muestran los resultados obtenidos del seguimiento durante el monitoreo fisicoquímico en el RGIA (Figuras 6-10).

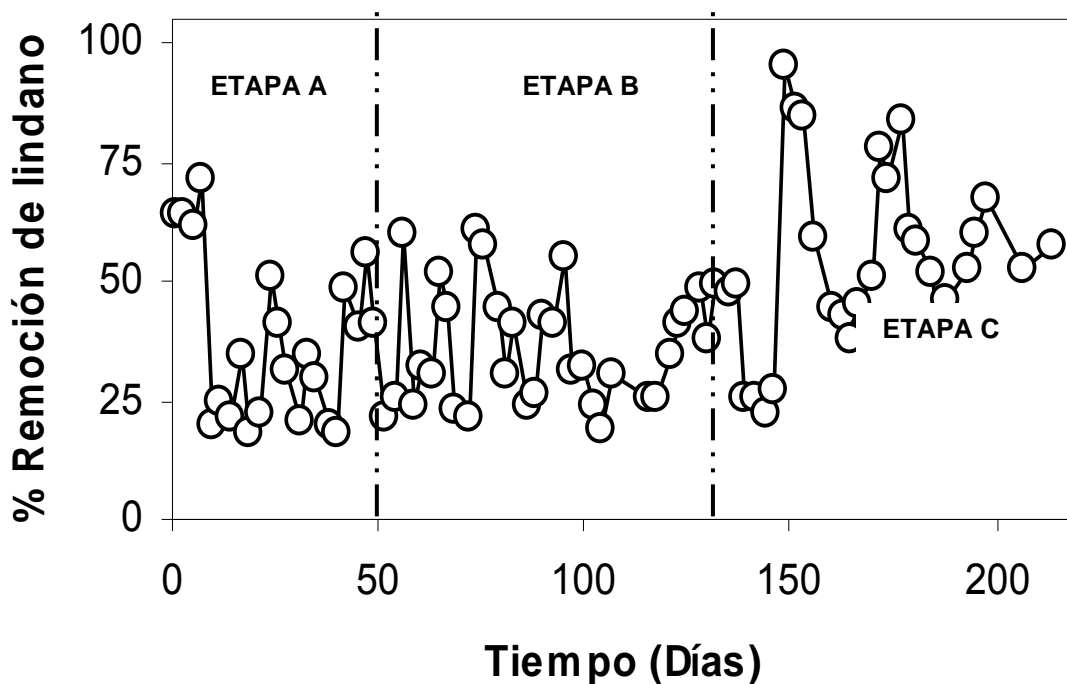


Figura 6. Remoción de lindano en el RGIA.

El análisis de los resultados anteriores ayudaron a determinar si las condiciones de operación del reactor podían ser modificadas (aumento en la concentración del contaminante), la remoción de lindano es el parámetro más importante, ya que nos indica si efectivamente el inóculo que se ha generado en el reactor esta degradando al lindano y así poderlo usar para la siguiente etapa de la investigación. La figura 6 muestra el porcentaje que se obtuvo durante la operación del reactor; durante las dos primeras etapas; esta remoción se registró un 40 y 36% de remoción del contaminante en promedio. Finalmente durante la última etapa se observa un ligero aumento en el porcentaje de remoción que fue del 56% en promedio, la remoción registrada en el RGIA no es satisfactoria, ya que en comparación con dos reactores más que se están operando en esta misma línea de investigación que son del tipo metanogénico y sulfato reductor se ha obtenido una remoción del 80% y 85% respectivamente.

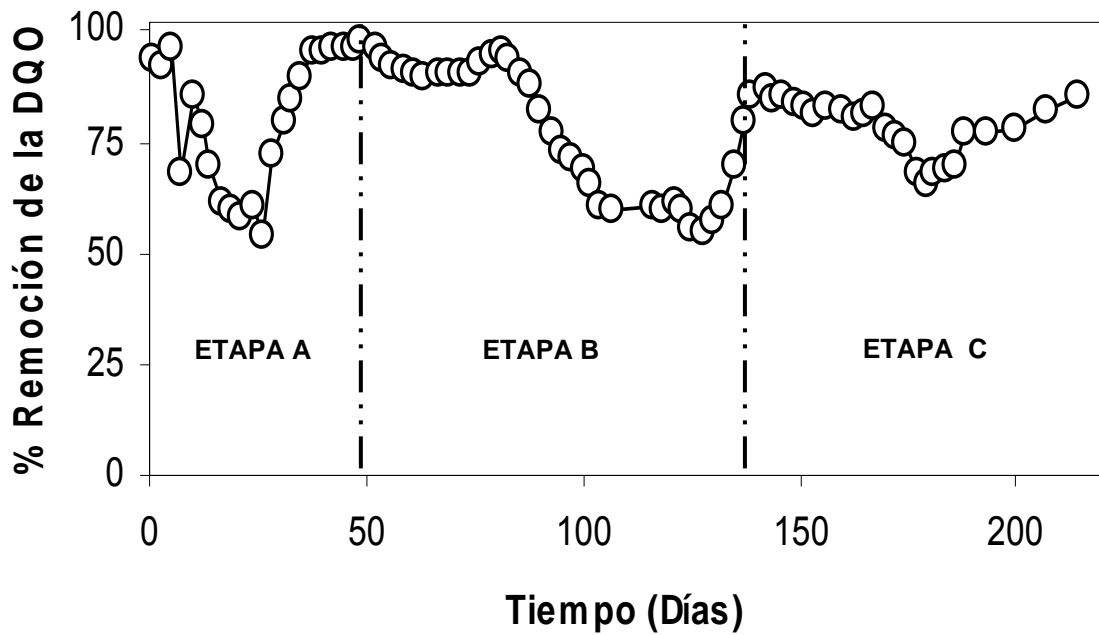


Figura 7. Remoción de la DQO en el RGIA.

En la figura 7 se observa que la remoción para las tres etapas se registró en un 80% en promedio para las tres etapas.

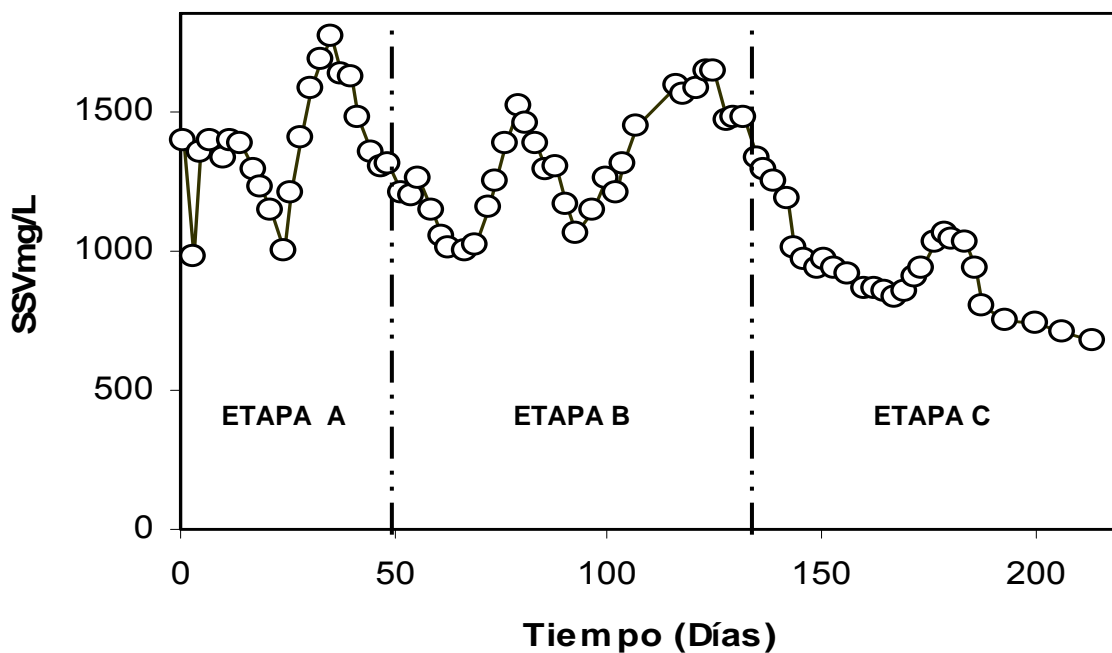


Figura 8. Concentración de biomasa en el RGIA.

La medición de biomasa se realiza a través de la cuantificación de sólidos suspendidos volátiles (SSV). Durante las dos primeras etapas la biomasa se mantiene constante en un rango de entre 1000 y 1400mg/L; en la figura 8 se aprecia la susceptibilidad de los microorganismos al lindano, ya que al aumentar la concentración del lindano en cada etapa la biomasa disminuyó pero no en forma significativa. En la

etapa C se observa que la biomasa decrece, esto podría deberse a que la concentración del contaminante rebasa la capacidad de degradabilidad de las bacterias por lo que se ve afectada la concentración de la biomasa.

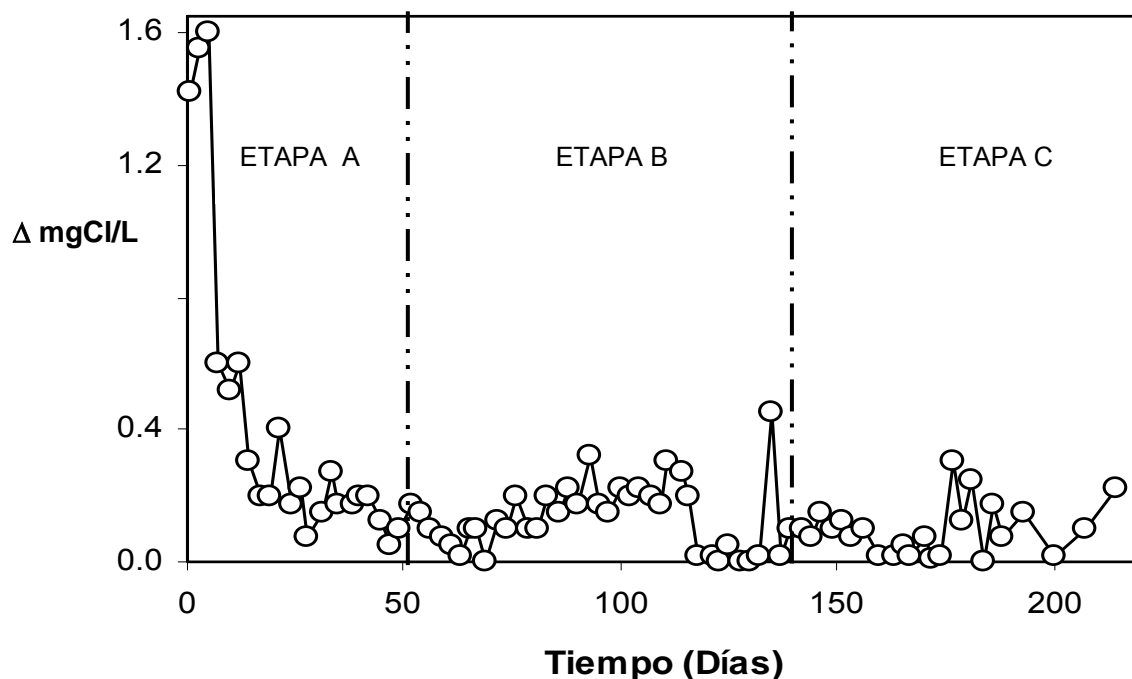


Figura 9. Concentración de cloruros en el RGIA.

La concentración de cloruros presentes en el RGIA indica de manera indirecta si esta ocurriendo una degradación por parte de los microorganismos. En la figura 9 se observa que al inicio de la etapa A la concentración de cloruros fue alta en comparación a las dos etapas posteriores, mostrándose en las etapas B y C una concentración constante, esta disminución podría deberse a que una parte del lindano no se mineralizó completamente y por lo tanto los iones no se encuentran libres en el medio.

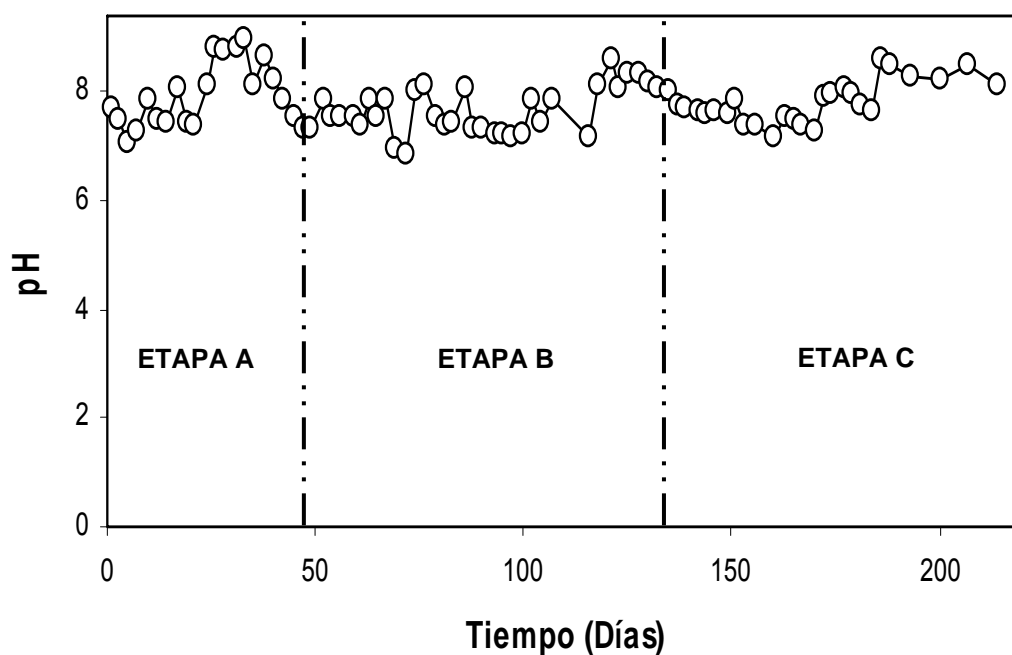


Figura 10. Valores de pH registrados en el RGIA.

El pH es un parámetro importante para el desarrollo de las bacterias, en la figura 10 se muestran los valores de pH que se registraron en el RGIA durante los 214 días de operación del mismo. Se observa que este parámetro se mantuvo constante en las tres etapas de operación, y se registró dentro de un intervalo de entre 7 y 9. La figura muestra además que no se registró un cambio apreciable en el pH al inicio de cada etapa, lo que indica que el contaminante no afectó de manera significativa el ambiente de los microorganismos.

**ACTIVIDAD 2: Monitoreo de parámetros microbiológicos (Cuenta total de bacterias (CTB) y cuenta de bacterias lindanolíticas (CBL).**

Para el monitoreo microbiológico en el RGIA se realizó la cuenta total de bacterias (CTB) y cuenta de bacterias lindanolíticas (CBL). En la figura 11 se muestra la cantidad de Unidad Formadora de Colonias registradas por litro (UFC/L) que se encontraron en el RGIA. Es importante hacer mención de que en total se observaron tres diferentes tipos de bacterias (Bacterias A, B y T), de las cuales solo dos se consideran degradadoras del contaminante (Bacterias B y T), esto se concluyó después de realizar la siembra de bacterias lindanolíticas donde la única fuente de carbón era el lindano, y se observó que de las tres bacterias presentes (A, B y T) solo B y T crecieron en este medio. La presencia de A se debe a que esta bacteria es resistente al contaminante pero no lo degrada.

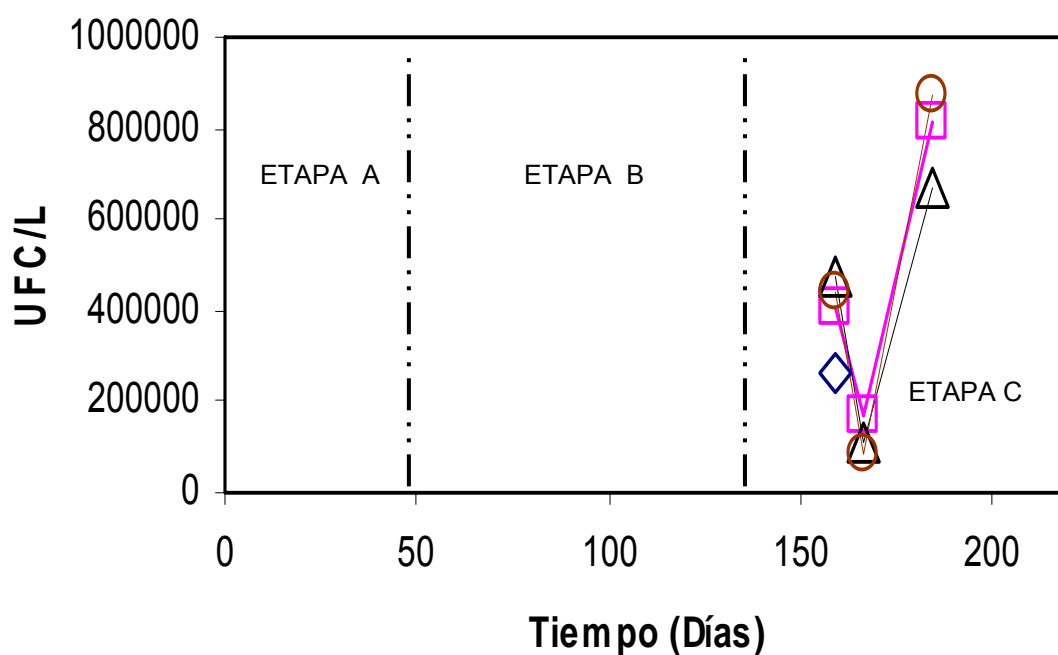


Figura 11. Unidades Formadoras de Colonias por litro (UFC/L) que se detectaron en el RGIA.

- UFC/L de bacterias A encontradas en la CTB (Cuenta Total de Bacterias)
- ◇ UFC/L de bacterias Totales en la CBL (Cuenta de Bacterias Lindanolíticas)
- △ UFC/L de bacterias T encontradas en la CBL
- UFC/L de bacterias B encontradas en la CBL

En la tabla 11 se muestra la descripción morfológica de las colonias de bacterias degradadoras y no degradadoras de lindano, detectadas en el RGIA, y en las figuras 12 y 13 se presentan imágenes de éstas.

Tabla 11. Morfología colonial de bacterias detectadas en el RGIA.

Bacteria	Forma	Elevación	Margen	Color
B	Irregular	Plana	Lobulado	Blanco
T	Puntiforme	Plana	Entero	Traslúcido
A	Circular	Convexa	Entero	Amarillo

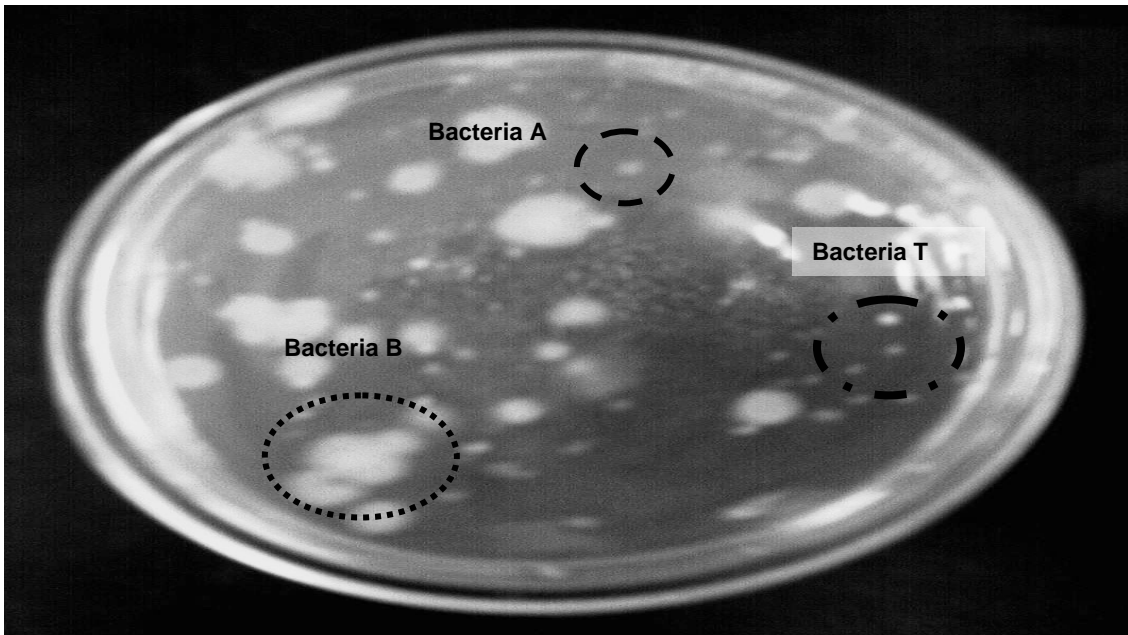


Figura 12. Bacterias totales detectadas en el RGIA

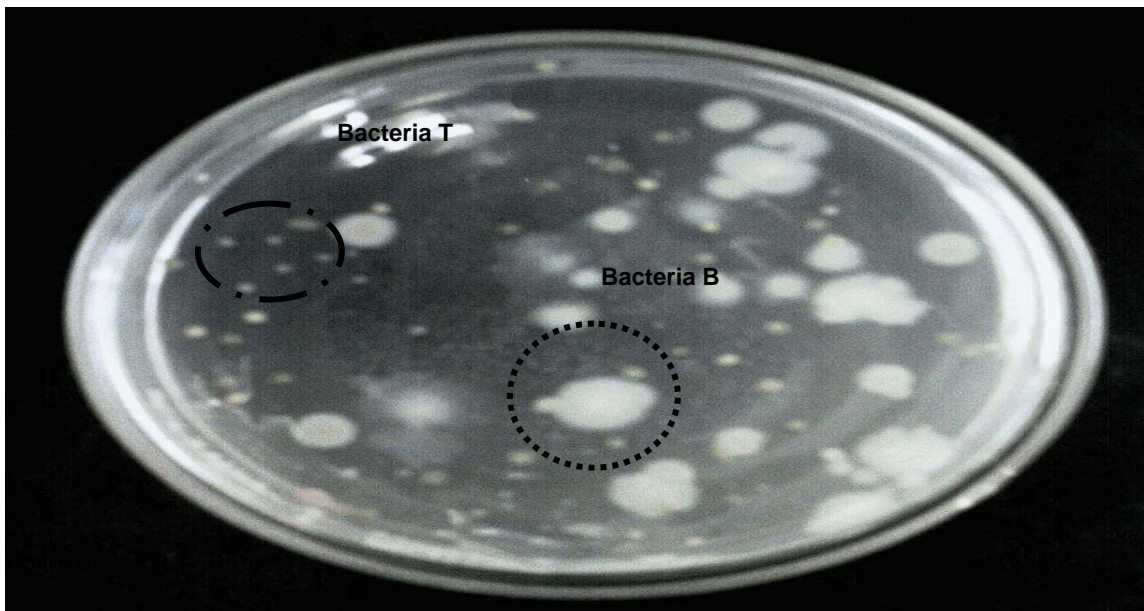


Figura 13. Bacterias lindanolíticas detectadas en el RGIA.





Tabla 12. Valores promedio de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos registrados por etapa en el RGIA.

Parámetro	Etapa		
	A	B	C
pH	7.90 $\pm$ 000.59	07.44 $\pm$ 000.43	07.81 $\pm$ 000.39
Remoción de DQO (%)	80.72 $\pm$ 014.56	79.46 $\pm$ 015.08	77.49 $\pm$ 004.06
Remoción de lindano (%)	40.00 $\pm$ 002.00	36.00 $\pm$ 001.00	53.00 $\pm$ 003.00
Concentración de Cl <sup>-</sup> (mgCl <sup>-</sup> /L)	00.42 $\pm$ 000.03	00.14 $\pm$ 000.01	00.11 $\pm$ 000.05
SSV (mgSSV/L)	1364 $\pm$ 042.00	1311 $\pm$ 0134.00	903 $\pm$ 078.00
Cuenta de bacterias lindanolíticas (UFC/L)	-----	-----	Bacteria B: 381E3 $\pm$ 1235.78 T: 346E3 $\pm$ 1189.02

### FASE 3: Realización de ensayos de degradación de lindano en reactores de suelos activados en ambiente aerobio.

ACTIVIDAD 1 y 2: Preparación de las unidades experimentales y controles de los RSA.

El suelo modelo que se utilizó para la preparación de los reactores de suelos activados (RSA) fue un suelo agrícola franco-arcilloso, traído del Estado de Oaxaca.

El suelo fue contaminado con una concentración de 100mg Lindano/kg suelo seco.

La composición del medio mineral utilizado para este sistema se presenta en la tabla 13.

Tabla 13. Composición del medio mineral utilizado en los RSA.

Componente	Concentración	Componente	Concentración
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.2 M)	33mL	FeSO <sub>4</sub>	23mg/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.2M)	67mL	MgSO <sub>4</sub>	22.5mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	180mg/L	CaSO <sub>4</sub>	31.5mg/L

Para este ensayo se manejaron dos unidades experimentales y dos controles. Para el diseño experimental del sistema de suelos activados se utilizaron botellas de vidrio de 150mL, 20g de suelo contaminado, 500mg SSV/L del inóculo aerobio, 60mL de medio mineral, todas las botellas se incubaron en oscuridad a 120rpm, el ensayo tuvo una duración de 30 días.

En la tabla 14 se presenta la composición para cada unidad experimental y cada control. Lo anterior se realizó por duplicado.

Tabla 14. Descripción de las unidades experimentales.

Control	Unidad Experimental	Sustrato		Suelo contaminado	
		Con sacarosa	Sin sacarosa	Esterilizado	No esterilizado
Biótico (CBA)	-----	X	-----	-----	X
Abiótico (CAA)	-----	-----	X	X	-----
-----	Con sustrato (RSAcs)	X	-----	X	-----
-----	Sin sustrato (RSAss)	-----	X	X	-----

### ACTIVIDAD 3: Seguimiento y análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

Los análisis fisicoquímicos se realizaron en los días 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 respectivamente.

Las figuras que se presentan a continuación muestran los resultados obtenidos del seguimiento del monitoreo fisicoquímico durante los 30 días de operación de los RSA (Figuras 14-17).

- ◇ Unidad experimental con sustrato (RSAss)      △ Control biótico (CBA)
- Unidad experimental sin sustrato (RSAs)      ○ Control abiótico (CAA)

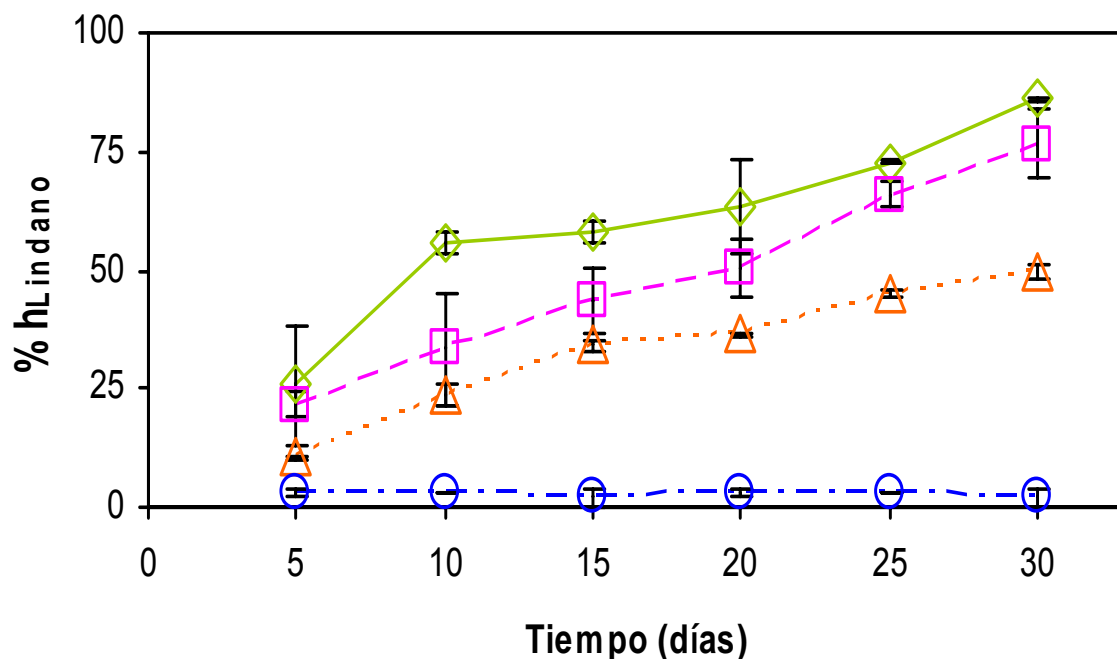


Figura 14. Remoción de lindano en los RSA.

En la figura 14 se observa claramente que la unidad que mayor remoción presenta en el sistema de suelos activados es la unidad experimental sin sustrato (RSAs) con una remoción del 86.1%, seguido de la unidad experimental con sustrato (RSAss) con una remoción de 76.7%, además se aprecia que el control biótico (CBA) presenta una remoción del 52%, lo que nos indica que los microorganismos autóctonos del suelo también actuaron como degradadores del contaminante junto con el inóculo aerobio generado en el reactor. El control abiótico (CAA) presenta una remoción del 20% lo que posiblemente pudiera deberse a la volatilización del contaminante.

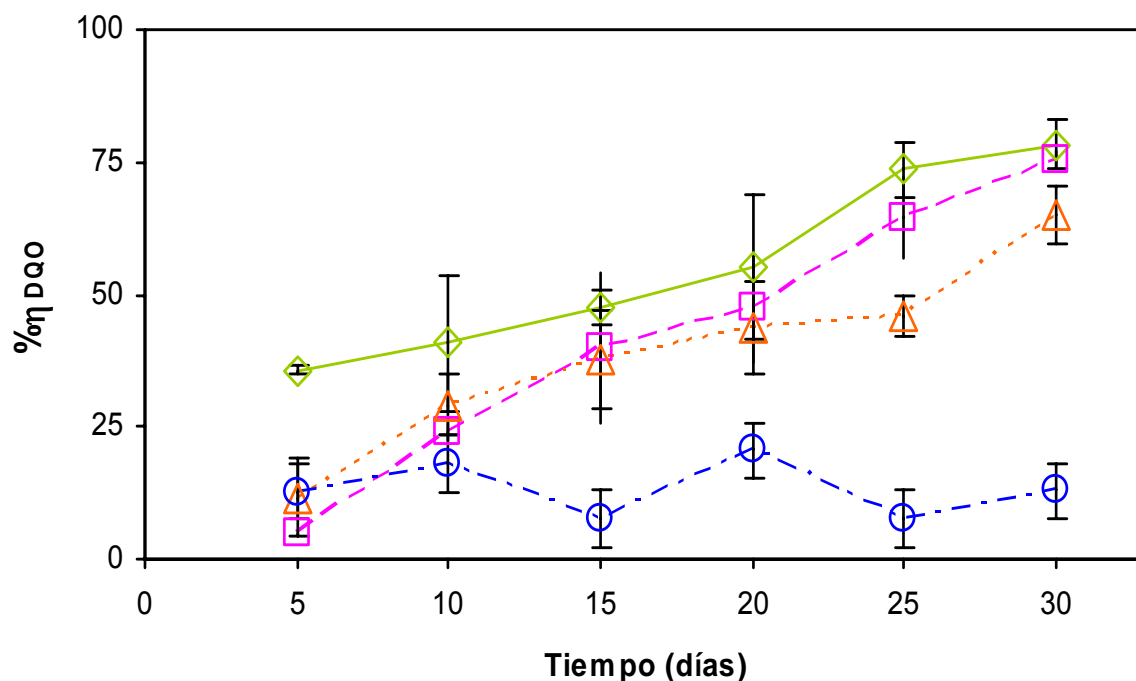


Figura 15. Remoción de la DQO en los RSA.

La figura 15 muestra la remoción de la DQO registrada en los RSA, en esta figura se aprecia que la RSAss presentó un mayor porcentaje de remoción (78.4%), seguido de la RSACs con una remoción de 72.6%, el CBA 64.9% y para el CAA un porcentaje de remoción de 12.9%.

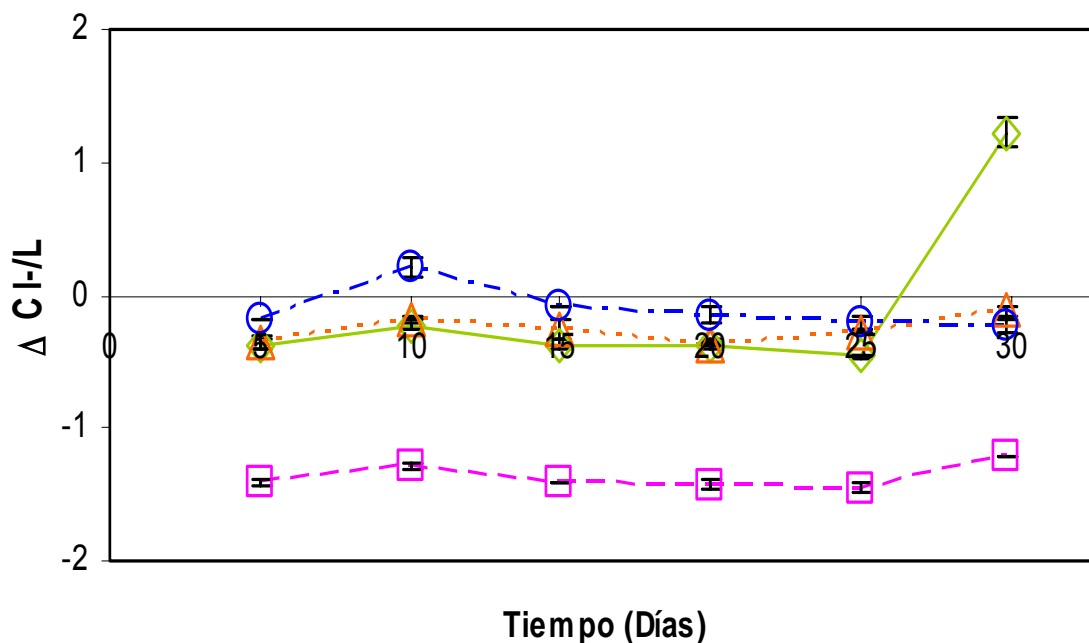


Figura 16. Incremento en la concentración de cloruros en los RSA.

En la figura 16 observamos que el único RSA que presentó un incremento en la concentración de cloruros fue el RSAss, esto en el día 30, los demás reactores registraron una concentración menor en los días posteriores al inicio de la cinética.

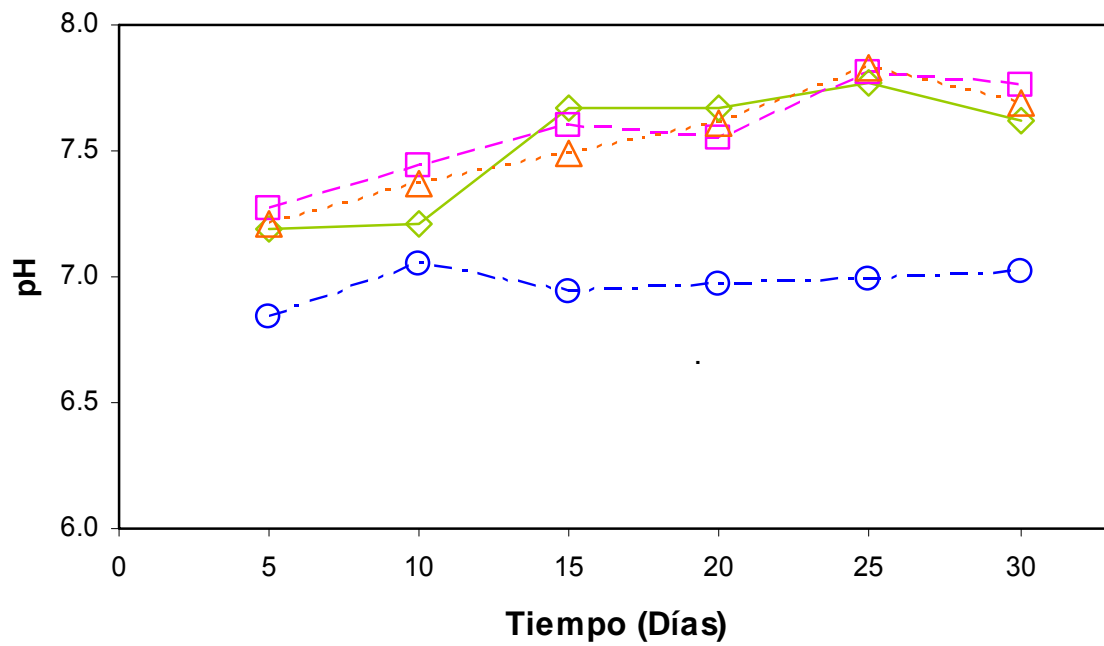


Figura 17. Valores de pH registrados en los RSA.

El pH registrado durante el ensayo en los RSA se mantuvo constante y no se observa variaciones importantes entre cada uno de las dos unidades experimentales y los controles, este parámetro se registró en un rango entre 6.8 y 7.2.



## 8 CONCLUSIONES

- El porcentaje de remoción del lindano promedio en el RGIA durante las dos primeras etapas (A y B) fue del 40% y 36% respectivamente, mientras que en la etapa C aumentó hasta un 54% en promedio. El porcentaje de remoción fue menos satisfactorio que en dos reactores anaerobios uno metanogénico y otro sulfato reductor, que se han monitoreado sobre esta misma línea de investigación presentaron una remoción del 80% y 85% respectivamente.
- Se detectó por morfología la presencia de tres bacterias (A, B y T) en el RGIA, de las cuales solo dos de éstas son lindanolíticas (B y T).
- La remoción de la DQO fue del 80% en promedio durante las tres etapas.
- La biomasa presentó una disminución en la concentración al inicio de cada etapa de aclimatación debido probablemente al efecto tóxico del lindano, pero se recupera la concentración posteriormente.
- La concentración de cloruros presentes en el RGIA se mantuvo durante las tres etapas constante.
- El pH se mantuvo constante durante las tres etapas de operación del RGIA, registrándose en rango entre 7 y 9.
- Se obtuvo un inóculo aerobio capaz de degradar al lindano.
- La mayor remoción de lindano que se obtuvo en los sistemas de suelos activados fue la unidad experimental sin sustrato (RSAss), con una remoción del 86.1% y posteriormente la unidad experimental con sustrato con una remoción del 76.7%.
- La RSAss registró una remoción de la DQO de 78.4% y la RSAcs un 75.2% de remoción.
- La adición de co-sustrato sacarosa tiene un efecto benéfico significativo sobre la remoción de lindano, mas no sobre la DQO.
- El RSAss presentó en el día 30 mayor concentración de cloruros.
- El pH registrado en los RSA fue tanto en las unidades experimentales como en los controles constante, en registrándose en un rango de entre 6.8 y 7.2.



## **9 RECOMENDACIONES PARA TRABAJO FUTURO**

- o No almacenar muestras durante períodos largos.
- o Realizar los análisis lo mas rápidamente posible.
- o Seleccionar otra técnica más sensible para la determinación de cloruros.
- o Llevar a nivel piloto los reactores de suelos activados.

## 10 REFERENCIAS

- Anderson, W. C. (1995). Innovative Site Remediation Technology: Bioremediation American.
- Bachmann A., De Bruin W., Jumelet J.C., Rijnaarts H.N., and Zehnder A.J.B. (1988a). Aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(2): 548-554.
- Bachmann A., Walet P., Wijnen P., De Bruin W., Huntjens J.L.M., Roelofsen W. y Zehnder A.J.B. (1988b). Biodegradation of alpha and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(1): 143-149.
- Brox, G. (1993). Bioslurry Treatment. Proceedings Applied Bioremediation. Fairfield, NJ, USA.
- Castaldi. F. J., Ford, D. L. (1992). Slurry bioremediation of petrochemical waste sludges. *Water Science & Technology.* **25**: 207-212.
- Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST). (2005).
- Cookson, J. T., Jr. (1995). Bioremediation Engineering. McGraw-Hill, New York, NY, USA.
- Diaz de Santos. (1992). Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. APHA-AWWA-WPFC.
- Fernández S., Ruiz A. y Rodríguez V. (1998). La biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados. *CINVESTAV.* 293-301.
- Geerdink, M. J. Kleijntjens, R. H., van Loosdrecht, M. C. M., Luyben, K. C. A. M. (1996). Microbial Decontamination of Polluted Soil in a Slurry Process. *ASCE-JEE.* **122** (11): 975-982.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). (2004). El lindano en México.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). (2005a). Restauración de suelos contaminados.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). (2005b). Tecnologías de remediación.
- Jerger, D. E., Cady D. J., Exner, J. H. (1994). Full-scale slurry-phase biological treatment of wood preserving wastes, In: (Hinchee, R.E. *et al.*, eds.) Bioremediation of Chlorinated and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, pp. 480-483.
- João de Barros A. M., Paulo Sousa J, Nogueira A. J. A. and Amadeu M. V. M. Soares. (2001). Bioaccumulation and elimination of <sup>14</sup>C-lindane by *Enchytraeus albidus* in artificial (OECD) and a natural soil. *Chemosphere.* **49**: 323-329.
- Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA). (2005).



- Marek J., Vevodova J., Smatanova J.K., Svensson L.A., Newman J., Takagi M., Damborsky J. (2000). Cristal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis*. *Biochemistry*. **39**: 16105 – 16114.
- Maroto A. y Rogel Q. (2001). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *GEOCISA. División Protección Ambiental de Suelos*. **15**: 297-300.
- Martinez-Toledo M. V., Salieron V., Rodelas B., Pozo C. and Gonzalez-Lopez J. (1993). Studies on the effects of a chlorinated hydrocarbon insecticide, lindane, on soil microorganisms.
- Miyacuchi K., Lee H-S., Fukuda M., Takagi M., Nagata Y. (2002) Cloning and characterization of linR, involved in regulation of the downstream pathway for  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (4): 1803-1807.
- Nagata Y., Futumura A., Miyauchi K., Takagi M. (1999) Two different types of dehalogenases, Lin A y Lin B involved in  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *J. Bacteriol.* **181**: 5409-5413.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-045-SSA1-1993. Plaguicidas. Productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado.
- Norma Oficial Mexicana, NOM-052-SEMARNAT-1993. Que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.
- Prescott L. M., Harley John P. y Klein D. A., "Microbiología", McGraw-Hill Interamericana, 4a edición, Madrid, 1999, pp. 111.
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2005). Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes, Propuesta sobre el lindano. Tema 5 d) del programa provisional.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). (2005).
- Ritter L., Solomon K. R. y Forget J. (1995). Informe de evaluación sobre: DDT, aldrina, dieldrina, endrina, clordano, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex, toxafeno, bifenilos policlorados, dioxinas y furanos. *Canadian Network of Toxicology Centres*. PCS/95.38.
- Ross, D. (1990). Slurry-phase bioremediation: case studies. *Remediation* **1**: 61-74.
- Stefanoff, J. G., Garcia, M. B., Jr. (1995). Physical conditioning to enhance bioremediation of excavated hydrocarbon contaminated soil at McClellan Air Force Base. *Environmental Progress*. **14** (2): 104-110.
- US Environmental Protection Agency (US EPA) (1990). Engineering Bulletin: Slurry Biodegradation. EPA/540/2-90/016.



US Environmental Protection Agency (US EPA) (1997). *Grace Bioremediation Technologies Daramend*. EPA/540/R-95/536.

Volke S. y Velazco T. (2002) *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. INE-SEMARNAT. México. pp. 6.

Weber W. J, Jr. and Corseuil H. X. (1994). Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water Research*. **28**:1407-1414.

[www.istas.net/portada/cops10](http://www.istas.net/portada/cops10)

[www.sbrtechnologies.com](http://www.sbrtechnologies.com)



# ANEXO A

## Métodos fisicoquímicos

### ○ Método estándar 423 (Determinación de pH)

#### Procedimiento

- a) Encender el potenciómetro.
- b) Calibrar el equipo con la solución patrón de pH, debe enjuagarse y secarse perfectamente bien antes y después de ser usado el electrodo.
- c) Una vez que ha sido calibrado el equipo, se coloca la muestra en un recipiente limpio y etiquetado y se introduce el electrodo para medir el pH.
- d) Agitar la muestra con precaución evitando que el electrodo golpee las paredes del recipiente.
- e) Una vez leído el valor se enjuaga y seca perfectamente y el electrodo es colocado en un recipiente con agua destilada limpia.
- f) Anotar el valor obtenido durante la medición.

NOTA: Deben utilizarse un frasco que contenga agua destilada limpia para colocar al electrodo cuando no se encuentre en uso y otro para enjuagar el electrodo cada vez que es utilizado. La solución patrón de pH no debe ser contaminada y el electrodo debe manejarse con cuidado ya que puede romperse fácilmente.

### ○ Método estándar 403 (Determinación de cloruros por el método de Mohr)

#### Preparación de reactivos

Se necesita agua exenta de cloruros; si es necesario, se eliminan las impurezas por medio de una redestilación o por medio de intercambio iónico.

#### Indicador de cromato de potasio

- a) Se disuelven 50g de  $K_2CrO_4$  en un poco de agua destilada.
- b) A la disolución anterior se le agrega una solución de  $AgNO_3$  hasta que se forma un precipitado rojo definido.
- c) Se deja reposar por 12 horas, se filtra y se diluye el filtrado a 1L. con agua destilada.

#### Solución valorada de $AgNO_3$ 0.041N

- a) Se disuelven 2.395g de  $AgNO_3$  en agua destilada y se diluyen a 1L
- b) Titular la solución anterior con  $NaCl$  0.014N

NOTA: La solución valorada de nitrato, exactamente 0.014N, equivale a 0.5mg de  $Cl^-$ /mL



### **Solución valorada de de NaCl 0.0141 N**

a) Disolver 824.1mg de cloruro de sodio (calidad ACS, previamente secado) en agua exenta de cloruros y se diluye 1L

### **Suspensión de AIOH**

a) Se disuelven 125g de alumbre de potasio o de amonio,  $K_2Al_2(SO_4):12H_2O$  ó  $(NH_4)_2Al_2(SO_4):12H_2O$  en 1L de agua destilada.

b) La solución es llevada a 60° C y se agrega lentamente con agitación 55mL de  $NH_4OH$  concentrado.

c) Dejar reposar 1h y pasar la muestra a un envase más grande, lavando el precipitado con agua destilada., a través de adiciones sucesivas, mezclando y decantando, hasta que se encuentre libre de cloruros.

### **Indicador de fenolftaleína**

a) Disolver 5g de fenolftaleína en 500mL de alcohol etílico o isopropílico al 95%.

b) Diluir la solución anterior con 500mL de agua destilada.

c) Agregar solución de NaOH hasta una débil coloración roja.

### **Solución de $H_2SO_4$ 1N**

a) Se agregan con agitación constante 20mL de  $H_2SO_4$  concentrado, con todo cuidado, a agua destilada y se diluye a 1L.

### **Procedimiento y cálculo**

a) Centrifugar la muestra a 7000rpm durante 20 minutos.

b) Usar una muestra diluida 1:100 tanto para la muestra centrifugada como para el agua de AAA, la determinación se hace por duplicado para cada muestra.

c) Agregar 1mL del indicador de  $K_2CrO_4$ .

d) Titular con una solución valorada de  $AgNO_3$  hasta un vire amarillo a rojizo.

e) Se lleva un testigo siguiendo los pasos anteriores, para este no se utiliza muestra sino agua destilada.

f) Para la cuantificación se realiza con la siguiente ecuación.

$$mgCl^-/L = \frac{(( B - A ) * N * 354.5 )}{mL \text{ de la muestra}}$$

Donde:

A = mL de  $AgNO_3$  gastados en el blanco

B = mL de  $AgNO_3$  gastados en el testigo

N = Normalidad del  $AgNO_3$



○ **Método estándar 203 (Determinación de SSV)**

**Procedimiento y cálculo**

- a) Insértese un disco de filtrado de fibra de vidrio en un crisol de Gooch.
- b) Llevar a peso constante el crisol, esto es a 100° C durante 2 horas, dejar enfriar y pesar posteriormente.
- c) Hágase vacío y lávese el disco con agua destilada.
- d) Filtrese 10mL de muestra bien mezclada.
- e) Llevar a la estufa a 100° C durante 1 hora, dejar enfriar y pesar.
- f) Colocar en una mufla para incinerar a 550° C durante 20 minutos, dejar enfriar y pesar.
- g) Para determinar la cantidad de SSV se realizan los siguientes cálculos:

$$\text{mgSST/L} = \frac{(B - A) * 1000000}{\text{mL de la muestra}} = C ; \quad \text{mgSSF/L} = \frac{(D - A) * 1000000}{\text{mL de la muestra}} = E$$

$$\text{mgSSV/L} = C - E$$

Donde:

A = Peso del crisol Gooch a peso constante

B = Peso del Crisol Gooch con la muestra después de haber sido secada en la estufa

D = Peso del crisol Gooch con la muestra después de haber sido calcinada en la mufla

○ **Método estándar 508 (Determinación de la DQO)**

**Preparación de reactivos**

**Preparación de la solución oxidante 0.25N**

- a) Se secan aproximadamente 15g de  $K_2Cr_2O_7$  en la estufa a 105° C durante 2 horas, después se deja enfriar en un desecador.
- b) Se pesa exactamente en la balanza analítica 12.259g.
- c) En 500mL de agua destilada se disuelve el  $K_2Cr_2O_7$  pesado y se afora a un volumen de 1L con agua destilada.

NOTA: Agregar 33.3mL de  $H_2SO_4$  concentrado para aguas que presenten cloro en el siguiente intervalo de concentraciones 200-500ppm.

**Solución catalizadora**

- a) A un litro de  $H_2SO_4$  concentrado agregar 11g de  $Ag_2SO_4$  y dejar reposar 1 ó 2 días hasta que se disuelva. Por razones de costo puede prescindirse de  $Ag_2SO_4$ .



### Preparación de Sulfato Ferroso Amoniacal (SFA) 0.05N

- Pesar 19.6g de SFA:6H<sub>2</sub>O, y disolver en 500mL de agua destilad, agregar lentamente 20mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, enfriar y aforar a un litro con agua destilada.
- El SFA se valora colocando en un matraz Erlen Meyer de 250mL y 2.5mL de agua destilada, 1.5mL de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y 3mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 1 gota de fenantrolina y agregar SFA hasta observar cambio de color.
- Aplicando la siguiente fórmula se determina la normalidad del SFA.

$$N \text{ SFA} = \frac{(N \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7) (1.5)}{\text{mL SFA}}$$

### Indicador 1-10-fenantrolina monohidratada

- Se pesa 1.485g de 1-10-fenantrolina monohidratada.
- Se pesan 0.695g de sulfato ferroso heptahidratado.
- Se disuelven las sustancias pesadas anteriormente en agua destilada en un matraz aforado de 100.

### Procedimiento y cálculos

- Centrifugar la muestra a 7000rpm durante 20 minutos.
- Para este procedimiento no se hace dilución para las muestras, pero para el agua de alimentación se realiza una dilución 2:4, el análisis se realiza por duplicado.
- Marcar el nivel al que llega un volumen de 7.5mL en los tubos especiales para determinar DQO micro.
- Poner en cada tubo 2.5mL de la muestra y 1.5mL de solución oxidante (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) y 3.5mL de solución catalizadora (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado).
- Prepara el blanco igual que en el punto c sustituyendo los 2.5mL de muestra por agua destilada.
- Agregar 3 perlas de ebullición a cada tubo para regular la ebullición.
- Agitar la mezcla antes de calentar para prevenir proyecciones por el calentamiento local del fondo del tubo, y colocar el condensador en la boca del tubo.
- Poner a reflujo entre 200 y 250° C durante 2 h.
- Dejar enfriar, si se evapora un volumen considerable de líquido reponerlo con agua destilada hasta la marca de 7.5mL.
- Transferir el contenido del tubo para DQO a un matraz Erlen Meyer de 250mL, agregar una gota de fenantrolina y titular usando la solución de SFA. El vire del indicador en el punto final es de azul verdoso a café rojizo.
- Para determinar la DQO se aplica la siguiente fórmula:



$$\text{mg. DQO/L} = \frac{6000 (A - B) * N * \text{FD}}{V}$$

Donde:

A = mL de SFA gastados en el blanco.

B = mL de SFA gastados en la muestra.

N = Normalidad del SFA.

FD = Factor de dilución.

V = Volumen de la muestra (mL)

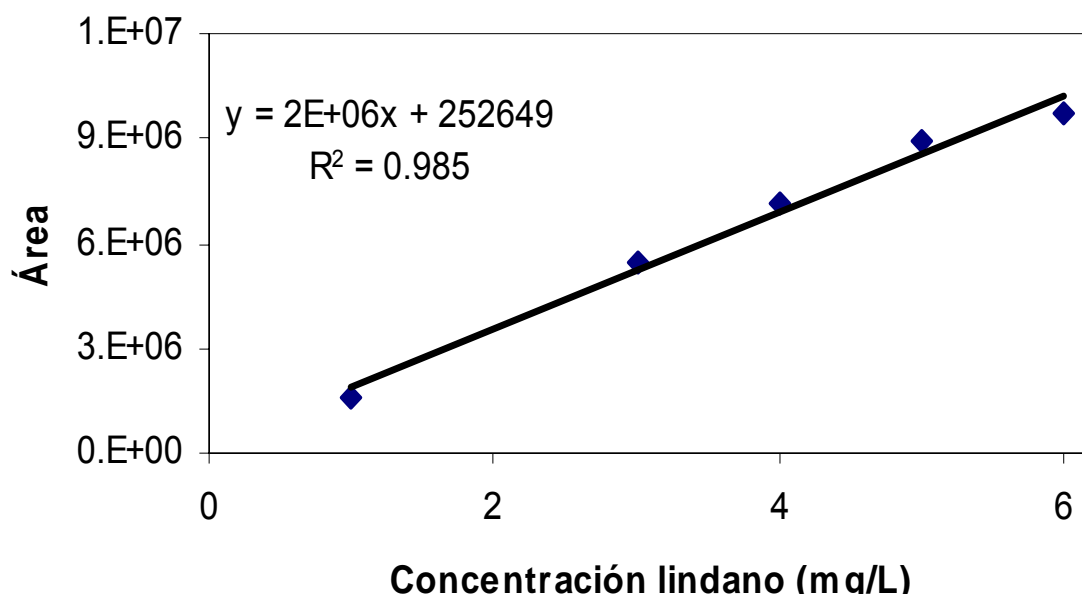
- **Cromatografía de gases (Polese *et al.*, 1996; Zuoloaga *et al.*, 2000)**

### Procedimiento

La cuantificación de lindano se realizó por headspace utilizando un cromatografo de gases Perkin Elmer equipado con detector de captura de electrones, la columna (Sepuelco) fue de 210° C, la del inyector de 250° C y la del detector de 350° C. El flujo de nitrógeno fue de 10psi.

### Cálculos

Para la determinación de lindano en el RGIA se realizó una curva tipo y se presenta a continuación.





# ANEXO B

## Métodos microbiológicos

- **Método estándar 907 (Cuenta total de bacterias )**

### Área de trabajo

a) Se deberá disponer de una mesa de amplia superficie en una habitación limpia, sin corrientes, bien iluminada o con una cámara de flujo laminar horizontal. Utilícense superficies de mesa o banco no porosas y desinfectese de mesa antes de realizar el análisis.

### Muestras

a) El tiempo máximo recomendado que debe transcurrir entre recogida de la muestra y su estudio es de 8 horas (máximo tiempo de intervalo, 6 horas; máximo tiempo de procesamiento, 2 horas. Si el análisis no puede iniciarse en las primeras 8 horas, manténgase la muestra a una temperatura inferior a 4° C, pero sin congelarla. No ha de permitirse que el intervalo máximo entre la toma de la muestra y el análisis supere las 24 horas.

### Preparación del material

a) Seleccionar pipetas de distintos volúmenes habiéndoles colocado con anterioridad un tapón de algodón, también deben prepararse suficientes cajas Petri, este material debe ser colocado en cajas metálicas diseñadas para cada uno (pipetas y cajas Petri) para esterilizar durante 4 horas a 200 ° C.

### Preparación de las muestras

a) Antes de proceder a su estudio, márquese cada placa con el número de la muestra la dilución, la fecha y cualquier otra información necesaria. Prepárese cada volumen de muestra o dilución como mínimo por duplicado. Utilícense cajas Petri de vidrio (65 cm<sup>2</sup>) o desechables de plástico (57c m<sup>2</sup>).

b) Mézclese cuidadosamente todas las muestras o diluciones mediante unos 25 movimientos completos de arriba abajo (y de adelante atrás). También se puede utilizar un agitador mecánico durante 15 segundos para agitar las muestras o las diluciones.

### Preparación de solución salina

a) Para realizar las diluciones deben prepararse suficientes tubos que contengan solución salina y estos deben encontrarse estériles (15lb y 121° C, durante 15min). Pesar 2g de NaCl y eso llevarlo a 1L.

b) Colocar 9mL de esta solución en tubos de ensaye con rosca o pueden ir tapados con tapones de algodón, esterilizar.





### **Dilución de la muestra**

a) Las diluciones se seleccionarán de forma que el número de colonias en una placa sea de 30 a 300. Se recomienda realizar la siembra a partir de la dilución  $10^{-4}$ .

### **Preparación del medio**

a) Pesar y colocar en un matraz 23g de Agar Nutritivo y llevar a 1L.

b) Disolver hasta que la solución sea clara y no se observen grumos, tapar el matraz con un tapón para mantener condiciones de esterilidad posterior, será necesario calentar esta solución, colocar el matraz en autoclave y esterilizar durante 15min a 15lb de presión y  $121^{\circ}$  C. Dejar enfriar.

### **Preparación de las placas**

a) Viértanse de 15 a 20mL del medio en cajas Petri estériles

b) Deje solidificar el agar, todo debe realizarse en condiciones de esterilidad, dejar incubar durante 24 horas para descartar contaminación en nuestras cajas que contienen ya al medio.

### **Procedimiento**

a) La siembra debe realizarse en condiciones estériles, así como el material que se vaya a ocupar.

b) Tómese con una pipeta de 0.1 a 0.5mL y colóquese al centro de la placa y vierta el contenido.

c) Con una varilla de vidrio estéril curvada, distribúyase el inóculo sobre la superficie del medio, girando el disco con la mano o por medio de una placa giratoria.

d) Déjese que el inóculo sea absorbido en su totalidad por el medio antes de ser incubado.

e) Incubar a  $35^{\circ}$  C durante 48 horas.

f) Llevar un control para verificar que no haya contaminación durante el tiempo de incubación.

### **Recuento y registro de colonias**

Después del tiempo de incubación cuéntese todas las colonias de las placas seleccionadas, se puede hacer uso de un contador de colonias Quebec.

Para el cálculo de UFC se realiza el siguiente cálculo.

$$\text{UFC/mL.} = \frac{\text{No. total de colonias o promedio}}{\text{No. dilución}}$$



- **Método estándar 907 (Cuenta de bacterias lindanolíticas)**

a) Para realizar la cuenta y siembra de bacterias degradadoras de lindano se realizaron los mismos pasos para la cuenta total de bacterias, solo que para bacterias lindanolíticas se utilizó Agar Bacteriológico (10g/L).

b) Y para la siembra de bacterias lindanolíticas se agregó en condiciones estériles 50mg/L de lindano disuelto en 30 mL de acetona. Las diluciones utilizadas fueron de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ .

NOTA: La preparación del medio, material, muestras, área de trabajo, solución salina, placas, etc., se realizaron de la misma manera que para cuenta total.



# ANEXO C

## Metodología para los RSA

- **Preparación del suelo modelo**
  - a) Tamizar el suelo base a través de una malla de 2mm. Secar el suelo base y la vermicomposta en la estufa a 100° C para eliminar la humedad.
  - b) Moler la vermicomposta en la licuadora 5 minutos y pasarla a través de una malla de 2mm.
  - c) Preparar el suelo modelo por cada 100g de suelo agregar 16.74g de vermicomposta para aumentar la cantidad de materia orgánica de 0.8 a 8%.
  - d) Tindalizar el suelo modelo (<2mm) sin contaminar a 121° C/lb por una hora, dejar incubar un día a 34° C. Repetir esta operación tres veces.
  
- **Contaminación del suelo**
  - a) Preparar una solución de 100mg lindano en 300mL de acetona. Agregar homogéneamente esta solución a 1kg de suelo modelo, mezclar el suelo con la solución. Dejar evaporar la acetona a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción.
  
- **Medio mineral**
  - a) Preparar el medio mineral aerobio con los siguientes compuestos: 33mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.2 M) y 67mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0.2M) para mantener un pH de 7.2, 180mg  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ , 31.5mg  $\text{CaSO}_4$ , 23mg de  $\text{FeSO}_4$  y 22.5mg  $\text{MgSO}_4$  en 1L de agua desionizada (Pesce y Wunderlin, 2004; Wang *et al.*, 2001). El medio aerobio esta formulado con una relación de 8C:1N, recomendada para sistemas aerobios.
  - b) Preparar cada uno de los medios minerales con sacarosa (1g/L) y sin sacarosa.
  
- **Tratamiento del inóculo**
  - a) Realizar los cálculos pertinentes para obtener el volumen necesario de licor de cada reactor inoculador para tener una concentración de biomasa de 500mg SSV/L en el RSA.
  - b) Colectar las células por centrifugación (7000rpm durante 10 minutos), lavarlas tres veces con buffer de fosfato (pH = 7.2) y finalmente resuspenderlo en una pequeña cantidad del mismo buffer (MacRae, 1969).



- **Unidades experimentales de los reactores de suelos activados**

- a) En botellas de vidrio de 150mL, colocar 20g de suelo estéril contaminado (100mg Lindano/kg suelo seco), 60mL de medio mineral y 500mg SSV/L de inóculo aclimatado al contaminante
- b) Colocar unidades experimentales con 1 g/L de sacarosa y otras sin co-sustrato.
- c) Realizar los ensayos por duplicado.
- d) Incubar en la oscuridad, a 120rpm, a 25° C en ambiente aerobio y 35° C para ambientes anaerobios, durante 30 días.
- e) Tomar muestra de cada uno de los RSA cada cinco días y realizar las determinaciones (pH, cloruros, DQO y remoción de lindano en el sobrenadante).

- **Controles**

- a) Colocar 20g de suelo estéril contaminado (100mg Lindano/kg suelo seco), 60mL de medio mineral, 500mg SSV/L de inóculo estéril aclimatado al contaminante y 500mg/L de ázida de sodio.
- b) Colocar 20g de suelo contaminado sin esterilizar (100mg Lindano/kg suelo seco), 60mL de medio mineral sin sacarosa, 500mg SSV/L de inóculo aclimatado al contaminante.