

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

CBS



Casa abierta al tiempo

EFFECTO DEL SECADO DE BIOPELICULA SOBRE  
SUS PROPIEDADES FISICAS Y BIOLOGICAS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**  
P R E S E N T A  
**BIBIANA CERCADO QUEZADA**

Septiembre 2000

---

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-0/Maestría en Biotecnología**.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS

EFFECTO DEL SECADO DE  
BIOPELICULA SOBRE SUS  
PROPIEDADES FISICAS Y  
BIOLOGICAS

En México, D.F. se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de SEPTIEMBRE del año 2000 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DR. SIMON GONZALEZ MARTINEZ;  
DR. SERGIO REVAH MOISEEV;  
DRA. BEATRIZ CARDENAS GONZALEZ Y  
DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de Resultados para la obtención del Grado de

Maestra en: BIOTECNOLOGIA

de: BIBIANA CERCADO QUEZADA

quien presentó una comunicacion de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

- APROBARLA -

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



BIBIANA CERCADO QUEZADA  
FIRMA DE LA INTERESADA

REVISOR

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT  
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA  
DIRECTOR DE DIVISION

PRESIDENTE

DR. SIMON GONZALEZ MARTINEZ

VOCAL

DR. SERGIO REVAH MOISEEV

VOCAL

DRA. BEATRIZ CARDENAS GONZALEZ

SECRETARIO

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación  
de resultados que presentó:

Bibiana Cercado Quezada

El día 12 de Septiembre del año 2000

Comité Tutorial

Tutor: Sergio Revah Moiseev

\_\_\_\_\_

Vocal

Asesor: Beatriz Cárdenas González

\_\_\_\_\_

Vocal

Asesor: Richard Auria

Sinodal: Simón González Martínez

\_\_\_\_\_

Presidente

Sinodal: Mariano Gutiérrez Rojas

\_\_\_\_\_

Secretario

Dedicó el presente trabajo en primerísimo lugar a mis padres Javier y Antonia que me dieron la educación, fuerza y confianza para perseguir y alcanzar mis metas.

A mis hermanos Javier, Mariela y Omar, por sus ejemplos de vida.

A mis profesores de Biotecnología, Jorge Haro, Jorge Garza, Rafael Chávez, Gerardo Saucedo, Ernesto Favela y Mariano Gutiérrez por sus ejemplos de profesionalismo y haber sembrado en mí la inquietud del trabajo de investigación.

JLC. Agradezco sinceramente al Dr. Revah por el apoyo personal y académico que me brindó durante mi estancia en su grupo de investigación.

A mis asesores Beatriz Cárdenas y Richard Auria por su orientación y consejos en el trabajo de investigación.

2017-685/02 Al Dr. José Sepúlveda, Coordinador de Microscopía Electrónica del CENICA, por su apoyo y asesorías, así como también por uso de las instalaciones del mismo organismo.

A mis compañeros de laboratorio Juan Antonio, Marisol, Sergio y en especial a Miguel Magaña por echarme la mano en el trabajo experimental.

Por último, y sin embargo los más importantes, a Juan y a nuestro bebé por el placer de estar juntos.

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de la desecación en biopelícula sobre acero inoxidable, para lo cual se creó un sistema de formación de la misma, se utilizaron diversas técnicas analíticas para caracterizarla biológica y físicamente, entre las cuales se encuentran observaciones en microscopía de barrido electrónico, mediciones de respirometría para actividad biológica, isotermas de adsorción de tolueno y de desorción de agua, además de mediciones de hidrofobicidad celular.

Para la formación de biopelícula tipo biofiltro percolador se diseñó y construyó un reactor que fue validado estadísticamente para la homogeneidad de formación de biomasa adherida en función de la posición dentro del reactor. En las condiciones experimentales establecidas la máxima producción de biomasa fija fue  $0.716 \pm 0.378$  mg prot/cm<sup>2</sup>.

Las observaciones con microscopía de barrido electrónico mostraron que la biopelícula formada con vapores de tolueno fue escasa y con baja formación de sustancias exopoliméricas (EPS) en comparación a aquella formada con glucosa en un sistema de recirculación. La colonización del soporte inició con la formación de una capa uniforme que lo cubría completamente, posteriormente se formaron colonias verticales con disposición heterogénea formando parches sobre la primera capa.

La actividad biológica de biopelícula con diferentes grados de desecación fue determinada por cinéticas y velocidades de consumo de sustratos. La desecación se realizó por equilibrio de la biopelícula con atmósferas de 100% HR a 32% HR. Las cinéticas de consumo de tolueno mostraron que la actividad biológica disminuyó con el grado de desecación hasta actividad nula. Se estimaron las tasas específicas de consumo de oxígeno para adiciones sucesivas de sustratos, los resultados obtenidos indican que la tasa de consumo de oxígeno disminuye con el nivel de desecación encontrándose un cambio crítico entre 97% HR y 84% HR.

Después de la desecación de biopelícula a diferentes niveles de humedad relativa, se rehumectaron por exposición a una atmósfera con 100% HR, por aspersion de agua destilada y por inmersión en agua destilada. Los tres métodos de rehumectación fueron eficaces para biopelícula con bajo grado de desecación, 97% HR y 100% HR. Se consideró como mejor método de rehumectación la inmersión, ya que en todos los niveles de desecación la

Los conocimientos generados durante el presente trabajo remarcan la importancia de evitar el fenómeno de secado en el lecho de biofiltración, la actividad biológica puede continuar pero no hacia la transformación de los contaminantes. En casos extremos esta actividad se pierde completamente, sin embargo, también se ha demostrado que con un proceso de rehumectación adecuado es posible recuperar dicha actividad. Es necesario considerar el daño que ha sufrido la biopelícula para elegir el proceso de rehumectación, esto puede lograrse con la medición de hidrofobicidad de las células, que indicará la menor o mayor posibilidad de rehumectarla; también empleando la isoterma de desorción de agua se puede estimar la actividad de agua y, por tanto, la viabilidad de la biopelícula midiendo el contenido de humedad de una muestra. Finalmente, la isoterma de adsorción de tolueno sobre biomasa ha permitido confirmar que durante los procesos de biofiltración, la adsorción sobre la biomasa es despreciable.

## INDICE GENERAL

Resumen	v
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Contaminación del aire	1
1.1.1 Contaminantes del aire y sus múltiples efectos	1
1.1.2 Estadísticas del medio ambiente del INEGI	3
1.1.3 Normatividad y programas para la calidad del aire	4
1.2 Tecnologías para el control de la contaminación del aire	10
1.2.1 Tecnologías fisicoquímicas	10
1.2.2 Tecnologías biológicas	14
1.3 Sistemas biológicos para tratamiento de aire	16
1.3.1 Desarrollo de tecnologías biológicas	17
1.3.2 Descripción de biotecnologías para tratamiento de aire	18
1.4 Biopelículas	21
1.4.1 Ocurrencia en el ambiente	21
1.4.2 Composición general de biopelículas	22
1.4.3 Biopelículas en sistemas de tratamiento de aire	24
1.5 Fenómenos físicos presentes en biofiltros	26
1.5.1 Adsorción	26
1.5.2 Desorción de agua	29
1.5.3 Hidrofobicidad	31
<b>2. Antecedentes</b>	<b>33</b>
2.1 Métodos empleados para caracterización de biopelículas	33
2.2 Estudios previos del efecto del agua en la operación de biofiltros	39
<b>3. Objetivos</b>	<b>45</b>
3.1 Objetivo General	45
3.2 Objetivos Específicos	45
<b>4. Materiales y Métodos</b>	<b>46</b>
4.1 Inóculo	46
4.2 Equipo para formación de biopelícula tipo biofiltro percolador	47

4.3 Condiciones de cultivo	48
4.4 Técnicas para análisis biológico de biopelícula	49
4.4.1 Mediciones de biomasa	49
4.4.2 Medición de respirometría	50
4.4.3 Observaciones microscópicas	52
4.5 Técnicas para análisis físico de biopelícula	52
4.5.1 Índice de Hidrofobicidad por partición en fase orgánica	53
4.5.2 Isoterma de adsorción de tolueno en biopelícula	53
4.5.3 Isoterma de desorción de agua en biopelícula	54
4.5.4 Actividad de agua de biopelícula	54
4.6 Diseño de experimentos y análisis estadístico	55
<b>5. Resultados y Discusiones</b>	<b>56</b>
5.1 Sistema para formación de biopelícula	56
5.2 Observaciones en microscopía	62
5.3 Actividad biológica bajo diferentes condiciones de humedad relativa	64 ← 2°
5.4 Actividad biológica de biopelícula rehumectada	72 ← 3°
5.5 Adsorción de tolueno sobre soportes y material biológico	77
5.6 Isoterma de desorción de agua	80 ← 4°
5.7 Hidrofobicidad de células constituyentes de biopelícula	88
<b>6. Conclusiones</b>	<b>92</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>94</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>99</b>
8.1 Soluciones	99
8.2 Curvas patrón	100
8.3 Metodología para SEM	101
8.4 Modelo logístico de Gompertz	102
8.5 Análisis estadístico. Constantes cinéticas en el modelo de Gompertz	103
8.6 Validación de la técnica de hidrofobicidad	104
8.7 Análisis estadístico. Ensayo de hidrofobicidad	110
8.8 Cinéticas de consumo de substrato	113

## INDICE DE FIGURAS

### Pág.

- 3 Fig. 1.1.2.1. Inventario de emisiones de la Zona Metropolitana del Valle de México 1994.
- 12 Fig. 1.2.1.1. Descripción de un lavador venturi.
- 20 Fig. 1.3.2.1 Esquemas de los sistemas de tratamiento biológico de aire. a) Biofiltro, b) Biofiltro percolador, c) Biolavador.
- 29 Fig. 1.5.2.1. Curva típica de secado de un material sólido.
- 30 Fig. 1.5.2.2. Representación de la isoterma BET
- 48 Fig. 4.2.1 Reactor para formación de biopelícula y su esquematización
- 57 Fig. 5.1.1 Evolución del pH en el cultivo de recirculación.
- 58 Fig. 5.1.2. Registro de temperatura
- 59 Fig. 5.1.3. Evolución de la biomasa de recirculación medida por espectrofotometría.
- 59 Fig. 5.1.4. Evolución de la biomasa de recirculación medida por proteína total.
- 63 Fig. 5.2.1. Aspecto de biopelícula con SEM. a) Cultivo con tolueno sobre PVC. b) Cultivo con tolueno sobre vidrio. c) Cultivo con glucosa sobre polipropileno. d) Estructura y colonización de biopelícula con glucosa sobre polipropileno.
- 65 Fig. 5.3.1a. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno y producción de dióxido de carbono de biopelícula sometida a 80 % HR.
- 65 Fig. 5.3.1b. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno y producción de dióxido de carbono de biopelícula sometida a 97% HR.
- 66 Fig. 5.3.2. Cinética de consumo de tolueno y ajuste al modelo de Gompertz.
- 67 Fig. 5.3.3. Cinéticas de consumo de tolueno a diferentes humedades relativas.
- 68 Fig. 5.3.4a. Actividad biológica de biopelícula desecada a 97% HR.
- 69 Fig. 5.3.4b. Actividad biológica de biopelícula desecada a 74% HR.
- 69 Fig. 5.3.5. Tasa específica de consumo de oxígeno de biopelícula sometida a tratamiento de desecación.
- 72 Fig.5.4.1. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno para biopelícula rehumectada

- con atmósfera de 100% HR.
- 73 Figura 5.4.2. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno para biopelícula rehumectada por aspersión.
- 74 Figura 5.4.3. Cinética de consumo de tolueno, oxígeno para biopelícula rehumectada por inmersión.
- 78 Fig. 5.5.1a. Isoterma de adsorción de tolueno sobre acero inoxidable
- 78 Fig. 5.5.1b. Isoterma de adsorción de tolueno sobre polipropileno.
- 79 Fig. 5.5.2. Isoterma de sorción de tolueno sobre biomasa seca.
- 80 Fig. 5.6.1. Cinética de secado de biopelícula a temperatura ambiente.
- 82 Fig. 5.6.2. Cinéticas de secado de biopelícula sobre distintos materiales.
- 82 Fig. 5.6.3. Velocidad de secado de biopelícula sobre soportes a temperatura ambiente.
- 83 Fig. 5.6.4. Contenido de humedad en biopelícula desecada a %HR controlada.
- 83 Fig. 5.6.5. Isoterma de desorción de agua en biopelícula.
- 84 Fig. 5.6.6. Isoterma de desorción de agua. Ajuste al modelo  $Y = a + [ bX / ( 1-X) ]$
- 84 Fig. 5.6.7. Isoterma de desorción de agua. Ajuste al modelo de BET.
- 85 Fig. 5.6.8. Cinética de secado de biopelícula sometida a 100% HR.
- 86 Fig. 5.6.9. Cinética de secado de biopelícula sometida a 98 % HR.
- 89 Figura 5.7.1. Hidrofobicidad de biopelícula con diferente contenido de humedad.
- 90 Figura. 5.7.2. Hidrofobicidad de biopelícula formada sobre distintos soportes.
- 90 Figura. 5.7.3. Hidrofobicidad de biomasa en suspensión cultivada con distintos substratos.

## INDICE DE TABLAS

### Pág.

- 6 Tabla 1.1.3.1. Valores normados para los contaminantes en México.
- 6 Tabla 1.1.3.2. Normas Oficiales Mexicanas para fuentes fijas.
- 14 Tabla 1.2.3.1. Comparación de costos de tratamiento entre tecnologías para control de la contaminación del aire.
- 15 Tabla 1.2.3.2. Comparación del consumo de combustible y energía entre tecnologías para el tratamiento de aire.
- 16 Tabla 1.3.1. Clasificación de bioreactores para tratamiento de efluentes gaseosos.
- 18 Tabla 1.3.1.1. Desarrollo de tecnologías para el tratamiento contaminantes gaseosos.
- 33 Tabla 2.1.1 Métodos para caracterización de biopelícula.
- 47 Tabla 4.1.1. Composición del medio mineral para propagación de inóculo y formación de biopelícula.
- 60 Tabla 5.1.1. Formación de biopelícula sobre acero inoxidable, mg prot/cm<sup>2</sup>
- 66 Tabla 5.3.1. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para biopelícula sometida a desecación en atmósferas de humedad relativa controlada.

# **1. INTRODUCCION**

## **1.1 Contaminación del aire**

En los últimos años las comunidades médica, científica e industrial han tomado conciencia del efecto nocivo de la contaminación atmosférica en los ecosistemas. En cualquiera de los casos, compuestos orgánicos volátiles (COV) contribuyendo a la formación de smog, compuestos clorados destruyendo la capa de ozono, o bien, compuestos odoríferos desagradables, se ha vuelto urgente el control y tratamiento de la contaminación de aire.

Por contaminación del aire se entiende la presencia en la atmósfera de sustancias en altas concentraciones y por períodos capaces de afectar la salud humana, los animales y las plantas; así como causar perjuicios económicos o deterioro del entorno (Del Puerto et. al. 1992).

### **1.1.1 Contaminantes del aire y sus múltiples efectos**

Las fuentes de contaminación del aire incluyen elementos de origen natural, emisiones resultantes de actividades humanas y aquéllas de origen industrial.

Entre las fuentes naturales de contaminación se encuentra el polvo, las emisiones volcánicas, las esporas, los polenes y las bacterias causantes de enfermedades. Las actividades agrícolas producen contaminación por el uso de insecticidas y herbicidas, quema de bosques, y quema de madera y carbón. Las fuentes tecnológicas (fijas y móviles) incluyen productos evaporados o volátiles de industrias de fundición, de productos químicos (pinturas, solventes), de procesos directos de conversión de energía y de la quema de carburantes para transporte, calefacción o producción de energía eléctrica. Los materiales emitidos por las industrias pueden ser aerosoles, gases, mezclas de sulfuro, nitrógeno y carbón; materias halógenas y radiactivas.

En general, los contaminantes del aire pueden presentarse en forma de gases, partículas sólidas o aerosoles líquidos. Estas formas pueden existir ya sea separadas o combinadas entre ellas. Los contaminantes gaseosos constituyen aproximadamente el 90% de la masa total emitida a la atmósfera. (Del Puerto, et. al. 1992).

Los contaminantes gaseosos y particulados proceden sobre todo de la combustión de carburantes, combustibles y de la incineración de desechos. Los vehículos de motor son los

principales responsables de las emisiones de CO y de hidrocarburos debido a la combustión incompleta del carburante.

Las partículas por su parte, atenúan la radiación infrarroja que llega a la corteza terrestre y, por tanto, pueden influir en el clima mundial, además de ser muy dañinas

Es interesante mencionar que los factores topográficos y meteorológicos influyen en el desplazamiento de los contaminantes, en su transformación física y química (para dar lugar a otros posiblemente más tóxicos) y en su eliminación de la atmósfera por procesos naturales.

Los efectos de la contaminación atmosférica se pueden agrupar según Del Puerto (1992) en :

- A) Daños a la economía, por pérdidas debidas a efectos directos e indirectos de la contaminación en la salud humana, en el ganado y en las plantas; pérdidas debidas a la corrosión de materiales y de construcciones; gastos por la aplicación de medidas para el control y tratamiento de emisiones.
- B) Daños a la vegetación, por la deposición y absorción de contaminantes en las plantas y por lluvias ácidas. Existen algunos contaminantes que causan daños a determinados cultivos; los efectos principales son alteraciones foliares, reducción del crecimiento, obtención de flores y productos de menor tamaño.
- C) Alteraciones del medio ambiente, como la atenuación de la radiación solar, el aumento de las emisiones calóricas y los cambios locales en las características de la precipitación. Como efecto regional se presenta la lluvia ácida y como global el efecto invernadero y la alteración de la capa de ozono.
- D) Daños a los animales, particularmente por el paso del contaminante desde las plantas forrajeras al ganado.
- E) Efectos fisiológicos sobre el hombre, en este caso la sensibilidad ante la contaminación dependerá de la edad, el sexo, el estado general de salud y nutrición, exposiciones simultáneas, enfermedades preexistentes y las condiciones ambientales humedad y temperatura en el momento de la exposición.

Las enfermedades utilizadas como índices en estudios epidemiológicos son la bronquitis crónica, el asma, el enfisema y el cáncer pulmonar.

La contaminación de la atmósfera rara vez produce efectos locales graves fuera de las grandes ciudades, donde se concentran grandes industrias, y el tránsito vehicular es numeroso; en los países subdesarrollados existe, además, la tendencia de urbanización irregular, tal es el caso de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM). Sin embargo, los efectos globales son de tal gravedad que ha sido necesaria la organización de cumbres mundiales, como la II Cumbre de la Tierra en 1997, la Cumbre de Río en 1992, entre otras.

### 1.1.2 Estadísticas del medio ambiente del INEGI

El estado del medio ambiente es resultado de actividades humanas que provocan transformaciones sobre los recursos naturales, de ahí las respuestas de la sociedad ante estos cambios a fin de detener, controlar, y revertir los problemas del deterioro de su entorno.

La calidad del aire en las zonas metropolitanas se explica, en parte, por la cantidad y calidad de los combustibles consumidos, por el tipo de tecnologías en la planta industrial, por la alta concentración de las actividades productivas y de población, por las condiciones meteorológicas existentes, y por la interacción entre los diferentes contaminantes y los componentes del aire que modifican la química atmosférica. (INEGI, 1998).

En la Fig. 1.1.2.1 se muestra la contribución de cada sector a la contaminación de aire en la ZMVM para 1994. La mayor contribución está dada por el sector transporte mientras que la menor está dada por el sector industria.

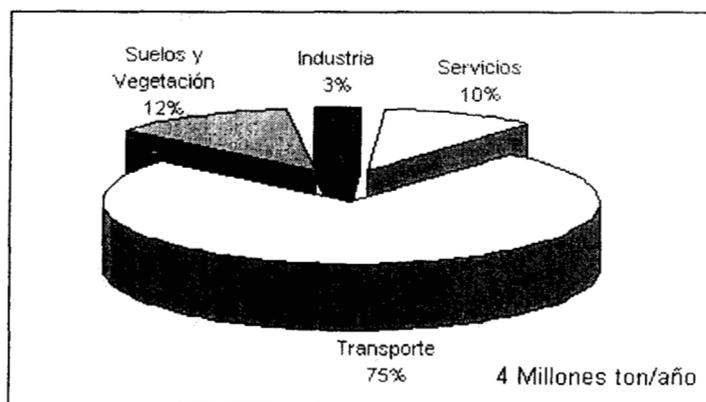


Fig. 1.1.2.1. Inventario de emisiones de la Zona Metropolitana del Valle de México 1994.

Fuente: Semarnap (1998).

A continuación se presentan algunas cifras referentes a los contaminantes de aire emitidos en el país, éstas fueron publicadas por el INEGI (INEGI-SEMARNAP, 1998). En 1990, México emitió 297 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> debido al consumo de combustibles fósiles y 40.5 millones de toneladas por el uso de combustibles basado en biomasa. Las emisiones de NO<sub>x</sub>, CO y CH<sub>4</sub> se incrementaron entre 1987 y 1993 en 19.8, 35.6 y 30.7%, respectivamente, estos gases en presencia de energía solar desencadenan reacciones fotoquímicas que forman en ozono y otros contaminantes formando el smog fotoquímico.

En el caso de las emisiones por sector, el de los transportes representa el 32% de las emisiones de CO<sub>2</sub> por consumo de combustibles fósiles, seguido por el de la generación de electricidad 23% y el de la industrial, 22%. El sector de transporte es también el principal contribuyente a las emisiones de NO<sub>x</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O y CO.

En lo que se refiere a la agricultura y cambio de uso de suelos, las emisiones de gases de efecto invernadero provenientes de la agricultura surgen principalmente del abono y la fermentación entérica del estiércol del ganado (1,749 miles de toneladas de metano), de cultivos específicos (35 mil toneladas de metano producido por arrozales), del uso de fertilizantes (5.55 mil toneladas de N<sub>2</sub>O) y de una familia de gases de efecto invernadero originados por la quema prescrita de desechos de cultivos *in situ*.

Respecto a los rellenos sanitarios, éstos contribuyen con 468 mil toneladas, lo que representa el 12.9% de las emisiones de metano del país. De esto el 41.6 % se concentra en el D.F. y 54.8% se distribuye en el resto del país.

En el contexto mundial, México se clasifica entre los 15 países con mayores emisiones de gases de efecto invernadero. Al mismo tiempo al compararse con el grupo de países en vías de desarrollo, solamente es superado por las emisiones de China, India, Brasil e Indonesia.

En 1990, contribuyó con menos del 2% de las emisiones globales, mientras que Estados Unidos produjo el 19% y la Unión Soviética el 13% (INEGI, 1998).

### **1.1.3 Normatividad y programas para la calidad del aire**

Es evidente la urgencia de desarrollar, evaluar y actualizar normas, leyes y programas para el control de la contaminación del aire. En este respecto las medidas de orden legislativo

tomadas en México han dado origen a Normas e índices de la calidad del aire, a la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA), al Reglamento en Materia de Prevención y Control de la Contaminación Atmosférica y a el Programa para Mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México 1995-2000, a continuación se detallan cada uno de ellos.

#### A) Normas e índice de la calidad del aire

El 23 de diciembre de 1994 la Secretaría de Salud publicó las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) para evaluar la calidad del aire respecto a ozono, bióxido de azufre, bióxido de nitrógeno, monóxido de carbono, plomo, partículas suspendidas totales (PST), y partículas suspendidas con diámetro menor de 10 micras (PM-10), que representan la fracción respirable de PST.

Actualmente existen 20 NOM sobre la calidad del aire, todas ellas relacionadas a máximos permisibles de contaminantes emitidos por fuentes fijas y móviles. Estas se agrupan como sigue:

- Calidad del aire
- Vehículos en circulación (NOM-041-ECOL-1996)
- Vehículos en planta (NOM-042-ECOL-1993)
- Procesos de combustión (NOM-085-ECOL-1994)
- Calidad de combustibles (NOM-086-ECOL-1994)
- Otras normas en materia de contaminación atmosférica

Las normas de calidad del aire establecen los niveles máximos permisibles de concentración de contaminantes que garantizan la protección de la salud de la población en general y también de los grupos más susceptibles, para lo cual las normas incorporan un margen de seguridad. Las normas son de observancia para las autoridades federales y locales que tengan a su cargo el desarrollo y la aplicación de los planes o programas de política ambiental. Las normas mexicanas de calidad del aire que se observan en la Tabla 1.1.3.1 y Tabla 1.1.3.2, son similares a las de otros países, en particular a las de los Estados Unidos y Canadá.

Tabla 1.1.3.1. Valores normados para los contaminantes en México.

CONTAMINANTE	EXPOSICION AGUDA		EXPOSICION CRONICA
	CONC.,ppm (TIEMPO PROM., h)	FRECUENCIA MAX. ACEPTABLE	
Ozono (O <sub>3</sub> )	0.11 (1)	1 vez cada 3 años	
Bióxido de azufre (SO <sub>2</sub> )	0.13 (24)	1 vez al año	0.03 ppm (media aritmética anual)
Bióxido de nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	0.21 (1)	1 vez al año	
Monóxido de carbono (CO)	11 (8)	1 vez al año	
Partículas suspendida totales (PST)	260 µg/m <sup>3</sup> (24)	1 vez al año	75µg/m <sup>3</sup> (media aritmética anual)
Partículas fracción respirable (PM-10)	150 µg/m <sup>3</sup> (24)	1 vez al año	50 µg/m <sup>3</sup> (media aritmética anual)
Plomo (Pb)	--	1 vez al año	1.5 µg/m <sup>3</sup> (media aritmética 3 meses)

Fuente: INEGI, SEMARNAP (1998)

Tabla 1.1.3.2. Normas Oficiales Mexicanas para fuentes fijas.

NORMA OFICIAL MEXICANA	NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE EMISIONES A LA ATMÓSFERA
NOM-039-ECOL-1993	Bióxido y trióxido de azufre y neblinas de ácido sulfúrico en plantas productoras de ácido sulfúrico
NOM-040-ECOL-1993	Industrias productoras de cemento
NOM-043-ECOL-1993	Partículas sólidas
NOM-046-ECOL-1993	Bióxido de azufre, neblinas de trióxido de azufre y ácido sulfúrico en plantas productoras de ácido dodecilbencensulfónico
NOM-051-ECOL-1993	Nivel máximo permisible en peso de azufre, en el combustible líquido, gasóleo industrial que se consuma por las fuentes fijas en el Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Continuación Tabla 1.1.3.2. Normas Oficiales Mexicanas para fuentes fijas.

NOM-075-ECOL-1995	Emisión a la atmósfera de compuestos orgánicos volátiles provenientes del proceso de los separadores agua-aceite de las refinerías del petróleo
NOM-085-ECOL-1994	Humos, partículas suspendidas totales, óxidos de azufre y óxidos de nitrógeno en fuentes fijas que utilizan combustibles fósiles
NOM-092-ECOL/1993	Requisitos de los sistemas de recuperación de vapores de gasolina en estaciones de servicio y de autoconsumo ubicadas en el Valle de México
NOM-093-ECOL/1993	Eficiencia de laboratorio de los sistemas de recuperación de vapores de gasolina en estaciones de servicio y de autoconsumo
NOM-097-ECOL/1995	Material particulado y óxidos de nitrógeno en los procesos de fabricación de vidrio en el País
NOM-105-ECOL/1996	Partículas sólidas totales y compuestos de azufre reducido total en plantas de fabricación de celulosa
NOM-EM-118-ECOL-1997	Especificaciones de protección ambiental que debe reunir el gas licuado de petróleo que se utiliza en las fuentes fijas ubicadas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Fuente: INEGI, SEMARNAP (1998)

### **B) Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA)**

En la LGEEPA se señalan los instrumentos de política, mecanismos y procedimientos necesarios para *controlar, reducir o evitar* la contaminación de la atmósfera, incluyendo la competencia de la Federación para expedir normas que establezcan la calidad ambiental de las distintas áreas, zonas o regiones del país; integrar y actualizar el inventario de fuentes emisoras de jurisdicción federal de contaminantes a la atmósfera; formular y aplicar programas para reducir la emisión de contaminantes a la atmósfera; promover y apoyar técnicamente a los gobiernos locales en la formulación y aplicación de programas de gestión de la calidad del aire; expedir normas para el establecimiento y operación de los sistemas de monitoreo de la calidad del aire; así como normar la operación y funcionamiento de las fuentes fijas de jurisdicción federal que emitan gases y olores, entre otros.

### C) Reglamento en materia de Prevención y Control de la Contaminación Atmosférica

Tiene por objeto reglamentar la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, en lo que se refiere a la prevención y control de la contaminación atmosférica.

El Reglamento define los procedimientos técnico-administrativos a que están sujetas las fuentes emisoras de contaminantes de jurisdicción federal, como son las licencias de funcionamiento y la cédula de operación anual. También define la actuación de las autoridades para establecer los inventarios de emisiones y los sistemas de información de la calidad del aire.

### D) Programa para Mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México 1995-2000

En 1990 se dio a conocer el Programa Integral Contra la Contaminación Atmosférica (**PICCA**), diseñado para el Valle de México y orientado a llevar a cabo una serie de estrategias para disminuir los niveles de contaminación atmosférica y proteger la salud de los habitantes.

Este programa incluía un inventario de las emisiones generadas por fuentes fijas y móviles. en el que se estableció que el 4.4% de las emisiones totales (4,356,391 toneladas/año) provenían de la industria y los establecimientos comerciales, el 77% era generado por las diversas formas de transporte, y el resto por la degradación ecológica.

Este programa tuvo sus mayores logros en el mejoramiento de la calidad de los combustibles, destacando el suministro amplio de una gasolina adecuada para vehículos dotados de convertidor catalítico y la reducción significativa del contenido de azufre en el combustóleo y en el diesel.

Más recientemente, en marzo de 1996 se dio a conocer el Programa para Mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México 1995-2000 (**PROAIRE**).

El PROAIRE tiene como objetivo lograr gradualmente menores niveles de contaminación y tener un menor número de contingencias al año. Este programa incorpora 94 medidas concretas cuya aplicación se espera que elimine el 50% de las emisiones de hidrocarburos, 40% de óxidos de nitrógeno y 45% de partículas suspendidas de origen antropogénico, para el año 2000.

Entre los instrumentos y acciones del PROAIRE se encuentra una nueva normatividad de óxidos de nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles para la industria y los servicios (incluyendo distribución y uso de gas LP y recuperación de vapores en gasolineras).

Dentro del PROAIRE se estimó que en 1994 las emisiones atmosféricas ascendieron a 4'009,629 ton/año, correspondiendo a la industria y los servicios el 12.9% del volumen total, en tanto que el transporte generó el 75.5% y el porcentaje restante los suelos y la vegetación. (INEGI; 1998).

Debido a los efectos de los contaminantes del aire sobre la salud humana, las especies vegetales y animales, y en general sobre el medio ambiente, al creciente consumo de combustibles fósiles y actividades agrícolas e industriales que generan dichos contaminantes y debido a la normatividad aún en desarrollo para el control de la contaminación del aire, es evidente la necesidad de contar con tecnologías que permitan dicho control, que cumplan y sobrepasen las normas actuales para detener y eliminar los problemas mencionados.

## **1.2 Tecnologías para el control de la contaminación del aire**

Para alcanzar los estándares de emisiones establecidos en normas, se están aplicando y/o desarrollando varias técnicas para el tratamiento de gases emitidos. Entre éstas se encuentran los métodos fisicoquímicos que incluyen la separación con ciclones, adsorción con carbón activado, lavadores, incineración, oxidación catalítica, (electro)filtración, tratamiento químico seco, reducción catalítica selectiva y métodos biológicos tales como biofiltración, uso biolavadores y biofiltros percoladores (Van Groenestijin, 1993).

En la selección de equipo para el control de la contaminación del aire se deben contemplar las características del contaminante (propiedades físicas y químicas, concentración), la presencia de partículas (forma de partículas y distribución de tamaño), en el caso de gases, la transferencia de masa, la capacidad de remoción y la caída de presión. La reactividad química del contaminante (corrosividad, abrasividad, toxicidad, combustibilidad). Así como también las características de la corriente gaseosa, flujo volumétrico, presión, temperatura, humedad.

Se deben considerar los requerimientos de potencia, de suministros y de mantenimiento a fin de realizar una adecuada evaluación económica de la tecnología propuesta (Mycock, 1995).

### **1.2.1 Tecnologías fisicoquímicas**

En general, el equipo para el control gaseoso incluye los procesos de combustión, absorción, adsorción y condensación, pero si se clasifica a los contaminantes del aire como

- a) Particulados, partículas de sólido o líquido con diámetro en el orden de micras (aerosoles) y
- b) Gaseosos, dióxido de sulfuro, óxidos de nitrógeno, ozono, monóxido de carbono, y vapores de gasolina, de solventes y de agentes limpiadores, entonces las tecnologías para su tratamiento se pueden ordenar bajo el mismo criterio, una descripción breve de algunas de ellas, hecha por Mycock (1995), se enlista a continuación.

## A) Tecnologías para remoción de partículas

- Sedimentador gravitacional

Consiste en una cámara de expansión en la cual la velocidad de la partícula se reduce lo cual permite a la partícula sedimentar bajo la acción de la gravedad. Se utiliza en la industria, pero se limita a la remoción de partículas de gran tamaño (40-60  $\mu\text{m}$ ) de diámetro. Existen dos tipos básicos de sedimentadores: cámara de expansión simple y la cámara de sedimentación de múltiples placas. Cuando se utilizan se complementan con otros equipos de colección. Se han empleado en la industria de refinera de metales, en la manufactura de alimentos. Sus ventajas son el bajo costo, bajo mantenimiento y sus desventajas son que requieren grandes espacios y tienen baja eficiencia (20 - 60%).

- Separador centrífugo (ciclón)

Su funcionamiento inicia con la entrada de una corriente que contiene partículas, ésta es forzada a girar, pero las partículas tienen demasiado momentum y no pueden girar, entonces colisionan con las paredes del ciclón, resbalan por las mismas y son colectadas en una tobera inferior. El diámetro y las dimensiones del ciclón determinan el tamaño de partícula que es colectado. Existen arreglos de ciclones en serie o en paralelo. Se utiliza en el control de partículas de carbón, en la industria de procesamiento de café, en la producción de fertilizantes y de detergentes, también en los procesos donde el equipo genera emisiones, tales como secadores, tamices, molinos, sistemas de transferencia de producto y almacenaje.

- Filtro de tela (baghouses)

Remueve las partículas de la corriente mediante un medio poroso y una torta de polvo como medio filtrante, emplean bolsas que se instalan en una cámara. El gas contaminado pasa a través del medio filtrante, el gas limpio sale por un lado del medio, mientras que el polvo es colectado en el otro lado. Periódicamente se remueve el polvo de la tela. Se emplean comúnmente en instalaciones de calderas.

## B) Tecnologías para remoción de gases

- Lavador húmedo (Wet scrubber). Lavador de Venturi

En este equipo se utiliza líquido para remover las partículas o gases de una corriente gaseosa. Existen diversas operaciones, el agua asperjada puede inyectarse en la corriente de gas, el gas puede ser forzado a pasar a través de películas de líquido, o el gas puede pasar a través de una cama de esferas de plástico cubiertas con líquido. Están diseñados para incorporar pequeñas partículas de polvo en grandes gotas de agua de diámetro 50 - 500  $\mu\text{m}$ . Esas gotas son colectadas por mecanismos como gravitación, impacto sobre mamparas o por acción ciclónica. Se utilizan químicos para oxidar los contaminantes, por ejemplo cloro, ozono, y permanganato. En la Fig. 1.2.1.1 se muestra un esquema de un lavador venturi.

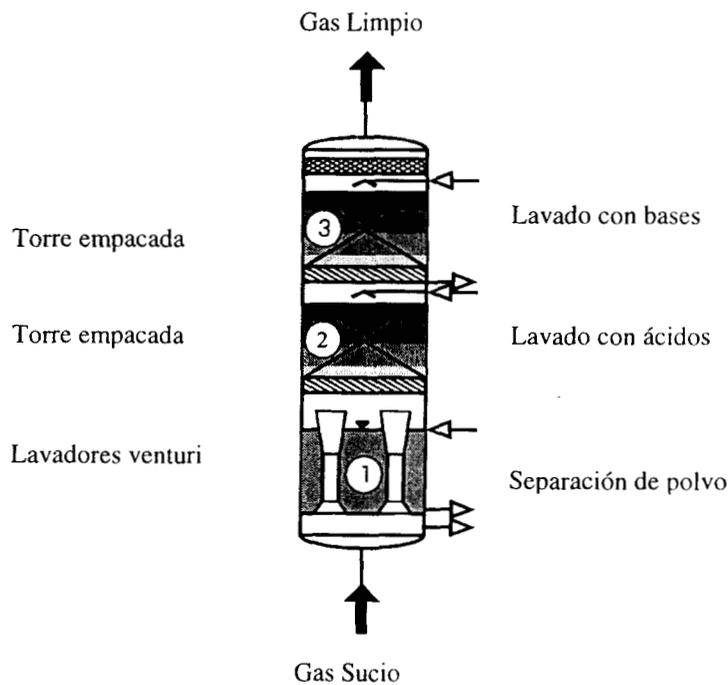


Fig. 1.2.1.1. Descripción de un lavador venturi.

Entre sus desventajas se encuentran problemas de corrosión, dificultad para recobrar los coproductos, y generación de lodos, transfiere la contaminación del aire al agua. Con

frecuencia se emplean en la industria del hierro y el acero, en la industria química, en la petrolera, en la industria de fertilizantes, de pulpa y de papel.

- Precipitador electrostático

Se basa en un sistema de descarga de electrodos que produce un fenómeno en el cual las moléculas gaseosas son ionizadas por colisiones de electrones en una región de un campo eléctrico alto, mientras se mantiene la distancia correcta y alineación hacia los electrodos de captura para evitar desbalanceo en el campo eléctrico. Tienen eficiencias superiores al 99% .

- Adsorción

El carbón activado adsorbe de 90 a 95% de compuestos orgánicos volátiles (COV) de la corriente si es regenerado o reemplazado regularmente. La efectividad de remoción disminuye según se satura el carbón, y cualquier vapor de agua interfiere en la adsorción del contaminante. Es una técnica adecuada para la remoción de pequeñas cantidades del contaminante, su eficiencia depende de la capacidad de adsorber compuestos del mismo, además, los compuestos orgánicos pueden ser recuperados en algunos casos. Pero bajo condiciones secas de sorción de gases, el carbón activado es flamable. (Leson & Winer, 1991; Bohn, 1992).

- Oxidación catalítica y térmica (Incineración)

La oxidación catalítica requiere altas temperaturas, de 150°C a 500°C, dependiendo del catalizador y del contaminante. Los catalizadores y recuperadores de calor reducen los costos de combustible pero a expensas de costos elevados de instalación y mantenimiento. La incineración se basa en la oxidación térmica de compuestos gaseosos que ocurren en fracciones de segundos. La incineración a altas temperaturas es rápida y mayor a 99% completa, sin embargo, requiere grandes cantidades de combustibles y produce óxidos de nitrógeno. Es apropiada para efluentes con altas concentraciones de contaminantes orgánicos, pero en corrientes diluídas aumentan los costos, además estos métodos no remueven metales (Leson & Winner, 1991; Bohn, 1992).

### 1.2.2 Tecnologías biológicas

El tratamiento biológico ha sido propuesto como un sistema para el control y la eliminación de algunos compuestos volátiles. En términos generales la purificación biológica es un proceso en el cual los gases contaminados son tratados al entrar en contacto con un medio biológicamente activo. El material biológico puede encontrarse inmobilizado o libre.

La degradación de los compuestos orgánicos consiste en transformarlos en compuestos más simples ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}^\circ$ ,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{NO}_3$ ) y una fracción de los compuestos orgánicos contaminantes pasan a formar parte del nuevo material celular.

Actualmente, esta técnica está siendo implementada en Europa, Japón y más recientemente en los E.U.A.. En dichos países se ha aplicado en la industria farmacéutica, química, de celulosa y papel, alimentaria, en plantas de tratamiento de aguas y donde se aplican pinturas tales como fábricas de automóviles, de muebles, talleres, etc. (Revah, et. al. 1996).

La biofiltración se dirige a sistemas que emiten relativamente bajas concentraciones de manera que la recuperación de químicos para reuso no es práctica o económica; no obstante, puede controlar la contaminación en pequeñas y medianas empresas.

Los métodos tradicionales para purificación de aire (lavador, adsorción, incineración, y combustión catalítica) tienen desventajas inherentes. Los oxidantes químicos son costosos y peligrosos, en algunos casos el contaminante sólo se transfiere y queda el problema de disposición del agua o carbón activado, éste último requiere regeneración periódica, en varios de ellos se necesita un elevado consumo de agua, energía, y combustibles, tienen además elevados costos de instalación y mantenimiento. No obstante, son técnicas rápidas y altamente eficientes. Por ejemplo, las tasas de oxidación de COV varían de fracciones de segundo en incineradores o segundos en lavadores químicos a minutos o días en biofiltros. Las reacciones rápidas requieren combustibles, químicos y mantenimiento, en cambio, las reacciones microbianas lentas y baratas requieren grandes volúmenes de reactor y grandes áreas de lecho. La biofiltración combina la sorción del carbón activado, el efecto lavador del agua y el efecto de la oxidación. La biofiltración remueve del 80% al 99% de un amplio rango de COVs y CIVs dependiendo de su reactividad química y biológica (Bohn, 1992).

La biofiltración es una tecnología ambiental amigable porque supone una oxidación completa de contaminantes en dióxido de carbono y agua sin generar corrientes de desechos residuales, además, requiere poca energía, pero no es adecuada para corrientes con altas concentraciones del contaminante, éste debe ser biodegradable y no tóxico a los microorganismos.

En lo referente al aspecto económico, en las Tablas 1.2.3.1 y 1.2.3.2 se comparan los costos totales para algunos métodos de control de contaminación de aire, en ellas se observa que la biofiltración tiene una ventaja considerable, aunque pueda variar para algunos casos.

Tabla 1.2.3.1. Comparación de costos de tratamiento entre tecnologías para control de la contaminación del aire (Bohn, 1992).

TECNOLOGIA DE TRATAMIENTO	COSTO TOTAL* POR 10 <sup>6</sup> FT <sup>3</sup> DE AIRE (USD)
Incineración	130
Cloración	60
Ozono	60
Carbón activado (con regeneración)	20
Biofiltración	8

\*Costos para 1991.

Tabla 1.2.3.2. Comparación del consumo de combustible y energía entre tecnologías para el tratamiento de aire (Bohn, 1992).

TECNOLOGIA	CONSUMO COMBUSTIBLE/QUIMICOS	CONSUMO ENERGIA
Incinerador	15 USD/ cfm	Despreciable
Lavador químico	Superior a 8 USD/ cfm	1 W /cfm
Biofiltro con suelo como soporte.	0	0.6 W / cfm

### 1.3 Sistemas biológicos para tratamiento de aire

Los reactores biológicos de fase gaseosa utilizan reacciones microbianas para tratar el aire contaminado. Son efectivos y económicos para degradar corrientes diluidas de compuestos biodegradables y no tóxicos. Básicamente operan haciendo pasar la corriente de aire contaminado a través de un lecho filtrante, éste puede ser orgánico o inorgánico, particulado o estructurado. El lecho filtrante es humedecido con cierta frecuencia dependiendo del tipo de sistema que se trate, y los microorganismos que han sido inoculados invaden el soporte. A medida que la corriente gaseosa atraviesa el lecho, los contaminantes, orgánicos o inorgánicos, son transferidos a la fase líquida y posteriormente a la fase biológica en donde son transformados produciendo compuestos menos tóxicos, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y más biomasa.

Las industrias que pueden aplicar tecnologías biológicas para el control de la contaminación de sus efluentes son las de producción de químicos y farmacéuticos, talleres e industrias de pintura y de impresión, crematorios, industrias de procesamiento de alimentos y aquellas que generan olores, industrias fundidoras, rellenos sanitarios y plantas de tratamiento de aguas residuales, la industria del petróleo y en la manufactura de petroquímicos, entre otras.

Los sistemas de tratamiento de aire biológicos pueden agruparse en biofiltros, biofiltros percoladores o rociadores y en biolavadores, la diferencia radica en el estado de la fase líquida que puede estar estacionaria o en movimiento como se esquematiza en la Tabla 1.3.1. (Revah, et. al. 1996; Devinny, et. al. 1999).

Tabla 1.3.1. Clasificación de bioreactores para tratamiento de efluentes gaseosos.

	LIQUIDO EN MOVIMIENTO	LIQUIDO ESTACIONARIO
Biomasa Suspendida	Biolavador	
Biomasa Fija	Biofiltro percolador	Biofiltro

### 1.3.1 Desarrollo de tecnologías biológicas

El uso del concepto básico de un sistema de biofiltración se realizó en 1923 para remover  $H_2S$  proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales. Los primeros biofiltros construidos eran abiertos y empleaban como soporte suelo poroso, se hacían huecos en el suelo y se colocaba un sistema de tubos perforados en la base para hacer pasar el aire. Se utilizaban en un principio para tratamiento de olores de plantas de tratamiento de aguas residuales. La primera aplicación de una patente de esta tecnología fue en 1934, para el tratamiento de compuestos olorosos o partículas biodegradables. A partir de 1950 se publican los fundamentos de la tecnología de biofiltración y se difunde en Estados Unidos y Alemania Occidental. En esta década se instalan biofiltros de tierra para tratamiento de olores en California, EUA y en Nuremberg, Alemania (Leson & Winer, 1991; Revah, et. al. 1996).

En los años 60s se inicia la investigación sistemática de los procesos de biofiltración para remoción de  $H_2S$ , sin embargo, el diseño de biofiltros seguía siendo empírico.

En la década de los 70s, el diseño de biofiltros permitía mayores cargas de olores y compuestos volátiles. El desarrollo de su diseño se efectuó principalmente en Alemania y Los Países Bajos, los sistemas seguían siendo abiertos pero se modificó la red de distribución de aire para evitar su taponamiento, se utilizaron también medios de soporte estructurados a fin de impedir la compactación y mejorar el flujo.

En la década de los 80s el desarrollo de los biofiltros fue rápido en Europa y lento en América. Se diseñaron sistemas cerrados operados por computadora para tratar olores, volátiles y mezclas, empleando medios filtrantes inorgánicos novedosos, como carbón activado granular sobre poliestireno y cerámicas. En 1986 se emplean técnicas de diseño avanzadas y se inicia el desarrollo de modelos matemáticos (Devinny, et. al. 1999).

Conforme las normas de calidad de aire se han vuelto estrictas, se han desarrollado sistemas más eficaces y baratos para el tratamiento de aire. En la década de los 90s las investigaciones se enfocaron a la creación de modelos que han permitido un mejor control de los procesos, a la utilización de nuevos soportes sintéticos que optimizan la remoción de compuestos, como membranas, textiles, y algunos polímeros, a las cinéticas de remoción de recalcitrantes.

además de nuevos diseños con reutilización de medios filtrantes, movimiento del lecho filtrante, distribución de flujo de aire, entre otros (Ostlie-Dunn, et. al. 1998; Sabo, et. al. 1998). En la tabla 1.3.1.1 se muestra un resumen del desarrollo de las tecnologías de tratamiento de compuestos gaseosos (Leson & Winer, 1991; Revah, et. al. 1996; Devinny, et. al. 1999).

Tabla 1.3.1.1. Desarrollo de tecnologías para el tratamiento contaminantes gaseosos.

1950	1960	1970	1980	1990
Tratamiento de olores	Investigación y desarrollo en Alemania y Países Bajos	Tratamiento de olores y COVs	Desarrollo en Europa y EUA. Tratamiento de olores y COVs	Desarrollo en Europa, EUA. Nuevos diseños de mayor eficiencia
Soporte suelo poroso	Suelo poroso	Suelo, composta y turba con materiales estructurados	Soportes inorgánicos, carbón activado, poliestireno, cerámica	Investigación de soportes sintéticos estructurales fibras y textiles
Sistemas abiertos	Sistemas abiertos	Sistemas abiertos	Sistemas cerrados con monitoreo	Sistemas cerrados con monitoreo y control

### 1.3.2 Descripción de biotecnologías para el tratamiento de aire

A) En un biofiltro, Fig. 1.3.2.1a, el gas que contiene compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles (COV y CIV), pasa a través de un lecho húmedo empacado con partículas orgánicas porosas. Los COV y CIV son sorbidos por el lecho de filtro biológico, entonces los microorganismos que se encuentran adheridos al material filtrante degradan aeróbicamente los compuestos químicos sorbidos (Mycock et.al. 1995). Los materiales de empaque generalmente son composta y turba, se adicionan materiales de relleno que evitan su compactación como

poliestireno, rocas de tezontle, trozos de madera, aserrín y otros. El área superficial específica gas/líquido varía de 300 a 1000 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> (van Groenestijn & Hesselink, 1993).

**B)** En los biofiltros percoladores, Fig. 1.3.2.1b, los microorganismos se fijan a un soporte inorgánico y los que se encuentran suspendidos en la fase acuosa degradan los compuestos que han sido absorbidos conforme la corriente gaseosa atraviesa el reactor. Operan con la fase acuosa y gaseosa moviéndose en cocorriente o contracorriente. Cuando el líquido es recirculado se pueden adicionar nutrientes o amortiguadores de pH para promover un ambiente de máxima remoción. El factor más importante en un biofiltro percolador es que debe hospedar una población microbiana en franco crecimiento, sin que éste sea excesivo para evitar obstrucción de flujos (Devinny et.al. 1999). Tienen menor área específica que los biofiltros 100 a 300 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup> por tanto inadecuado para compuestos poco solubles en agua (van Groenestijn & Hesselink, 1993).

**C)** En los biolavadores, Fig. 1.3.2.1c, el líquido que limpia la corriente gaseosa es liberado continuamente en la parte superior del empaque y gotea hacia el fondo en dirección de un colector de líquido. La corriente contaminada se introduce a presión por la parte inferior del equipo y se dirige hacia la superficie del lecho empacado en contra corriente a la dirección del líquido, ésto asegura una mayor absorción de gases tóxicos y compuestos odoríferos. La absorción puede llevarse a cabo en una columna empacada, una torre de rocío o una columna de burbujeo. Después de que ha ocurrido la absorción del contaminante, el líquido se transfiere a un recipiente diferente en donde su degradación es efectuada por un consorcio de microorganismos en suspensión. Este recipiente se airea adecuadamente para asegurar la máxima degradación. La fase de líquido libre contribuye al suministro continuo de nutrientes, a la remoción de metabolitos tóxicos, conteniendo la biomasa suspendida para una continua inoculación y ayudando a la difusión de compuestos hidrofílicos dentro de la biopelícula (Devinny et.al. 1999).

Aunque la remoción de contaminantes en sistemas biológicos de tratamiento de aire está dada por procesos de adsorción, absorción en el medio filtrante y oxidación por microorganismos, es ésta última la que los transforma y elimina completamente convirtiéndolos en agua y dióxido de carbono, por esta razón se considera uno de los componentes más importantes.

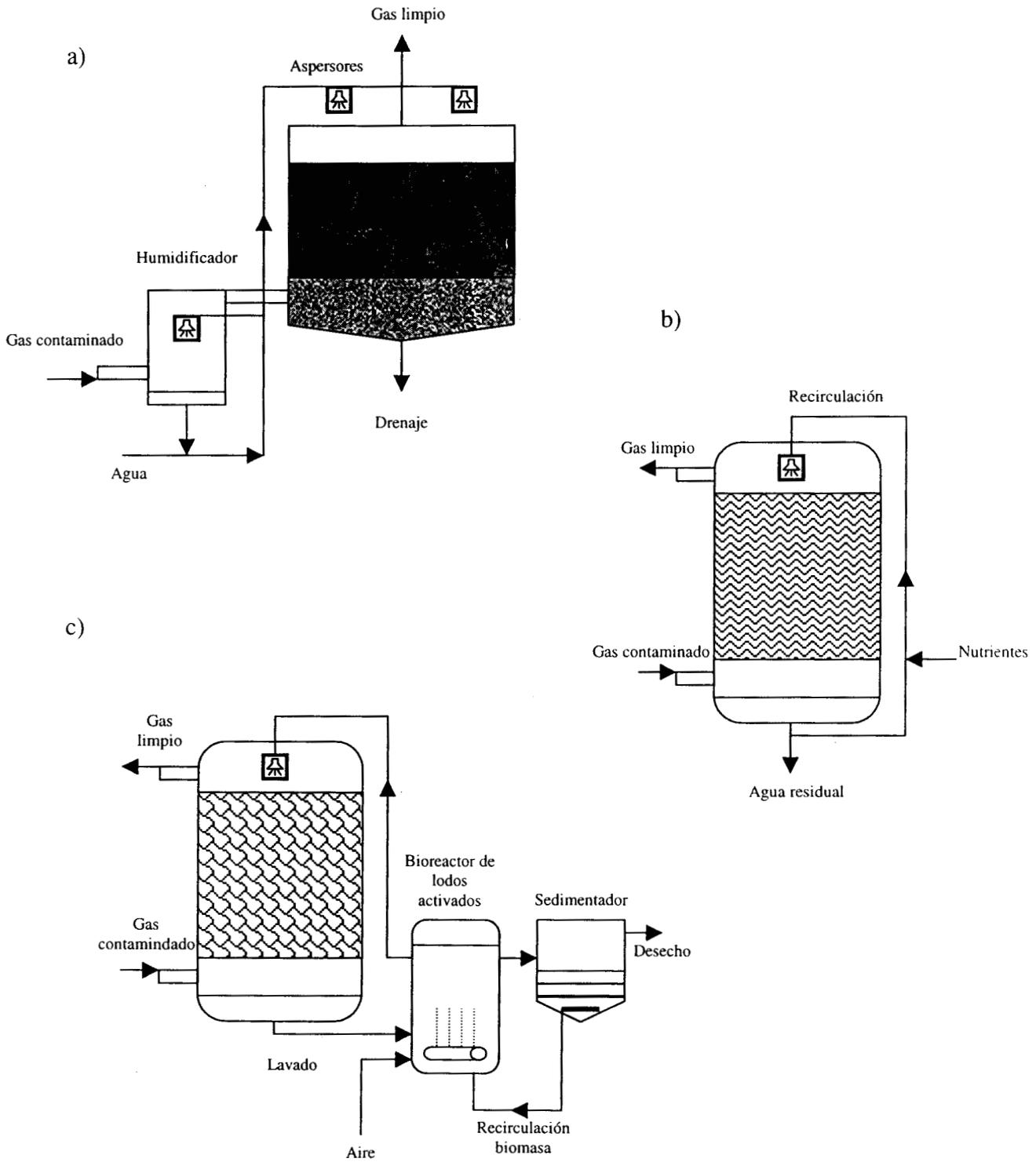


Fig. 1.3.2.1 Esquemas de los sistemas de tratamiento biológico de aire. a) Biofiltro, b) Biofiltro percolador, c) Biolavador.

## **1.4 Biopelículas**

Las biopelículas bacterianas en ambientes acuosos son estructuras heterogéneas compuestas por agregados celulares que se mantienen unidos por una matriz de sustancias extracelulares, entre ellos se encuentran espacios vacíos y canales que permiten la difusión de nutrientes. Las biopelículas pueden considerarse hidrogeles altamente porosos (Stoodley, et. al. 1999).

Solo recientemente los investigadores han tomado conciencia de la casi universal asociación de los microorganismos con superficies y la relación con ellos mismos. En la última década se han llevado al cabo investigaciones sistemáticas en varios campos incluyendo microbiología, medicina, e ingeniería para obtener un mejor entendimiento de la composición, fisiología, y dinámica de biopelículas dirigido al desarrollo de modelos y sistemas que permitan su control y aprovechamiento.

### **1.4.1 Ocurrencia en el ambiente**

Las biopelículas tienen un origen extremadamente antiguo, como lo demuestra la presencia de estromatolitos en el registro fósil. La adaptación de la vida a la existencia en biopelículas debe haber ocurrido en las primeras etapas de la evolución, las características y propiedades de las biopelículas son el resultado de miles de millones de años de selección natural y evolución (Palenik, et. al., 1989). Los sistemas microbianos se encuentran en todas partes, las células se organizan ellas mismas en películas sobre la superficie de sólidos con beneficios ecológicos, el microorganismo logra mantenerse en un ambiente favorable y evita ser apartado uniéndose él mismo a superficies (Devinny, et. al. 1999). Las biopelículas pueden encontrarse en casi todas las superficies expuestas a agua independientemente del estado trófico, se pueden localizar acumuladas en los lechos de ríos o sobre partículas suspendidas en lagos y en ambientes marinos, creciendo en asociación con raíces de plantas, en instalaciones de tratamiento de agua y drenajes, y en sistemas animales incluyendo el ser humano. Artificialmente se desarrollan en sistemas modelo de laboratorio, reactores de biopelícula, útiles en la industria de fermentación y en la industria farmacéutica por inmovilización de células sobre materiales específicos usados como acarreadores (Wilderer & Characklis, 1989).

Las biopelículas pueden ser benéficas o perjudiciales dependiendo donde se encuentran, se consideran benéficas

- ◆ En lechos de ríos y en ambientes marinos remueven contaminantes
- ◆ En raíces de plantas aumentan la disponibilidad de nutrientes
- ◆ En sistemas de tratamiento de aguas
- ◆ Reactores de biopelícula
- ◆ Aplicaciones farmacéuticas

Por otra parte, se consideran dañinas en

- ◆ Acumulación en sistemas de tratamiento provocan taponamientos
- ◆ Acumulación en intercambiadores de calor
- ◆ Tuberías y cascos de barcos
- ◆ Corrosión de materiales
- ◆ Caries dental
- ◆ Monumentos
- ◆ Infecciones en órganos e implantes.

#### **1.4.2 Composición general de biopelículas**

Se define un sistema de biopelícula por un soporte, la biopelícula misma, y el medio en el cual está inmersa, que en su caso puede ser un líquido, una atmósfera gaseosa húmeda o una película líquida limitada por un espacio gaseoso (Wilderer & Characklis, 1989).

La presencia de un soporte es fundamental para el desarrollo de biopelículas, generalmente se consideran soportes sólidos, sin embargo, es posible su formación entre dos fases líquidas inmiscibles. Las características del soporte sólido definirán los procesos de colonización, desarrollo e incluso su fisiología; entre ellas se encuentran el tipo de material, orgánico o inorgánico, la degradabilidad, la toxicidad, la porosidad y rugosidad, el área superficial, la permeabilidad a ciertas moléculas, además de ciertas características físicas como hidrofobicidad, energía superficial, propiedades como adsorbente, entre otras. (Wilderer & Characklis, 1989).

El siguiente elemento es la fase biológica. Las células que conforman las biopelículas pueden ser bacterianas, fúngicas o levaduras, en sistemas abiertos se encuentran protozoos, nemátodos, algas, y rotíferos entre otros. La actividad de los microorganismos en el interior de la biopelícula depende de las condiciones ambientales en las que se encuentra, en sistemas de tratamiento de contaminantes, sólo una pequeña fracción de la población es activa. Naturalmente las biopelículas las conforman consorcios o cultivos mixtos, en ella se presenta una sucesión de poblaciones y las interacciones propias entre microorganismos, tales como comensalismo, mutualismo, simbiosis, etc. En laboratorio se desarrollan biopelículas con cultivos puros o poblaciones binarias para el estudio de colonización e interacción entre microorganismos (Wilderer & Characklis, 1989; Palenik, et. al. 1989; Lazarova & Manem, 1995; Devinny, et. al. 1999).

La colonización del soporte es favorecida por la formación de una película condicionante, compuesta por residuos celulares y otras partículas que funcionan como nutrientes. Primero ocurre la adsorción reversible de la célula al soporte, lo cual sucede en segundos, enseguida, en unos cuantos minutos se presenta la adhesión irreversible, posteriormente comienza el crecimiento y multiplicación, lo cual toma de horas a días, entonces inicia la producción de exopolímeros y la formación de la biopelícula propiamente dicha, finalmente se adhieren otros organismos y va cambiando la población. La biopelícula madura comienza a degradarse por erosión, abrasión, desprendimientos, separación total del soporte y predación. La adsorción de las células al soporte es mediada por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, la adhesión es favorecida por la presencia de fimbria, pili, cápsulas y por la formación de sustancias exopoliméricas. La multiplicación de las células confiere la estructura a la biopelícula, las colonias crecen horizontal o verticalmente hasta poblar completamente la superficie (Marshall, 1997; Asmusa, 1999).

Las colonias se encuentran embebidas en una matriz de exopolímeros llamada glicocalix, éste posee características de un hidrogel viscoelástico debido a su composición, ya que las hebras de polímeros que lo forman poseen estructuras multihelicales y se agregan mediante puentes de hidrógeno para formar geles viscoelásticos altamente hidratados (Stoodley, et. al. 1999). En el glicocalix predominan los polisacáridos como alginato, gelano, xantano, que representan arriba del 65% de materiales extracelulares, pero también están presentes otras sustancias

como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Algunos exopolímeros contienen glicoproteínas, glucósidos o glucofosfatos. Se encuentra, además, materia inorgánica como precipitados de calcio, metales y arcillas. El estudio de los componentes del glicocalix está enfocado a determinar la proporción y estructura de la red de polímeros, esto implica la aplicación y desarrollo de métodos de extracción y caracterización que no perturben la arquitectura de la biopelícula (Lazarova & Manem, 1995; Palenik, et. al. 1989).

La fase líquida que cubre a la biopelícula permite el transporte de células, la difusión de nutrientes hacia el interior y de metabolitos de desechos hacia el exterior por los poros y canales de la matriz. En la interfase ocurren fenómenos de transferencia tales como deposición y atrapamiento de partículas, y el movimiento de sólidos producto del desgaste de la película (Wilderer & Characklis, 1989).

### **1.4.3 Biopelículas en sistemas de tratamiento de aire**

La biopelícula puede ser muy diferente en biofiltros, generalmente están colonizados por bacterias, levaduras y hongos ya que por su tamaño producen una razón superficie/volumen alta ideal para un rápido consumo de contaminantes. Las bacterias son generalmente más pequeñas y más activas que los hongos y pueden dominar en un biofiltro con alto contenido de agua y pH cercano a la neutralidad. Los hongos se vuelven más abundantes si el biofiltro ha sido secado o es más ácido y pueden degradar sustancias complejas, pueden crecer en el espacio de aire, su superficie hidrofóbica permanece seca y ellos absorben el substrato directamente de la corriente de aire. La elevada área superficial de los hongos filamentosos puede facilitar la transferencia de compuestos (Devinny, et. al. 1999).

Si el sistema de tratamiento es abierto se colonizará por nuevas especies de bacterias y hongos, también se pueden encontrar protozoos ciliados, amoeboe, nemátodos y algas dependiendo de la movilidad de la fase acuosa y de la naturaleza del inóculo. Los organismos superiores pueden actuar como predadores en el control de biomasa.

La comunidad microbiana varía con la profundidad de la película. Las capas más profundas pueden encontrarse con limitaciones de substratos de manera que los organismos modifican su metabolismo o bien cambia la población. Además, las comunidades microbianas cambian en

las tres dimensiones de los sistemas de tratamiento, se han hecho observaciones de la alta heterogeneidad de la biopelícula en biofiltros (Cárdenas-González, et. al. 1998; Devinny, et. al. 1999).

La eficacia en la remoción de contaminantes está dada por la velocidad de transformación microbiana y por los procesos de transferencia y transporte. La superficie irregular de la biopelícula provee mayor superficie para la transferencia de masa, pero conforme engrosa, se vuelve una barrera para el transporte. Se han observado poros y canales en la matriz que promueven la transferencia de oxígeno de la fase acuosa por advección más que por difusión. El agua dentro de la matriz, considerada un hidrogel, es estacionaria, así es suprimida la advección y la difusión es el único modo de transporte (Stoodley, et. al. 1999). Si los microorganismos son muy activos, pueden consumir el sustrato a mayor velocidad que la de su difusión, por lo que las células en el interior de la biopelícula quedan sin sustrato. En este caso la tasa de tratamiento es controlada por la tasa de difusión en la biopelícula más que por la cantidad de biomasa presente. Si el sustrato es abundante y rápidamente degradado, puede que el oxígeno no penetre a una velocidad suficientemente rápida para suministrar a los microorganismos, y la parte más profunda de la biopelícula se vuelve anaerobia. Entonces las especies aeróbicas dominan cerca de la superficie de la biopelícula, mientras que otras están presentes en la zona anaeróbica. La concentración de sustrato varía con la profundidad y las especies en la superficie deben ser aquellas capaces de degradar altas concentraciones de contaminantes, mientras que especies en lo profundo pueden sobrevivir con bajas concentraciones, coproductos o materiales de desecho y células muertas. Debido a que la fase acuosa puede contener una población de microorganismos en suspensión que pueden soportar altas concentraciones, ellos contribuyen significativamente a la actividad global de remoción (Villaverde, et. al. 1997; Xu, et. al. 1998).

Por otra parte, la biomasa de la biopelícula puede obstruir los poros y reducir el área superficial total de transferencia de gas disponible. En casos extremos, el flujo es restringido a unos cuantos canales, la transferencia es muy lenta y el biofiltro falla. Por ello los procesos de desgaste de biopelícula son necesarios para evitar el taponamiento del biofiltro, además de exponer continuamente nuevas superficies para más crecimiento de biopelícula y el consumo de contaminantes (Devinny, et. al. 1999).

## 1.5 Fenómenos físicos presentes en biofiltros

### 1.5.1 Adsorción

La adsorción es un fenómeno interfacial resultante de las fuerzas diferenciales de atracción o repulsión que ocurre entre moléculas o iones de las diferentes fases en las superficies de contacto expuestas. De acuerdo con las diferentes fases que pueden estar en contacto, pueden ocurrir varios tipos de adsorción, tales como la adsorción de gases sobre sólidos, o gases sobre superficies líquidas, o de líquidos sobre sólidos (Hillel, 1980). Existe una diferencia entre adsorción y absorción, la adsorción es una adhesión o repulsión superficial y la absorción se refiere a una fase que penetra o permea otra. Con frecuencia es imposible separar ambos fenómenos sobre todo en sistemas altamente porosos, entonces se emplea el término sorción.

La adsorción siempre ocurre en cierta medida cuando una superficie limpia es expuesta a vapor (gas por debajo de su temperatura crítica y por tanto condensable). Invariablemente la cantidad adsorbida sobre una superficie sólida depende de la temperatura absoluta, la presión absoluta, y del potencial de interacción  $E$  entre el adsorbato y el adsorbente, por lo tanto para cierta presión y temperatura de equilibrio, el peso del gas adsorbido por unidad de peso del adsorbente está dado por

$$W = f(P, T, E)$$

Usualmente la cantidad adsorbida es medida a temperatura constante y la ecuación anterior se reduce a

$$W = f(P, E)$$

Una gráfica la  $W$  vs  $P$  a temperatura constante se denomina isoterma de adsorción de un vapor y una interfase sólida particulares (Lowell & Shields, 1991).

Dependiendo de la fuerza de interacción todos los procesos de adsorción pueden dividirse en adsorción química y física. La primera también se llama adsorción irreversible o quimisorción, se caracteriza por grandes potenciales de interacción, lo que lleva a altos calores de adsorción cercanos a valores de enlaces químicos. La quimisorción involucra verdaderos enlaces químicos del vapor de gas con la superficie sólida, por ello ocurre con frecuencia por arriba de la temperatura crítica del adsorbato. Usualmente está asociada a una

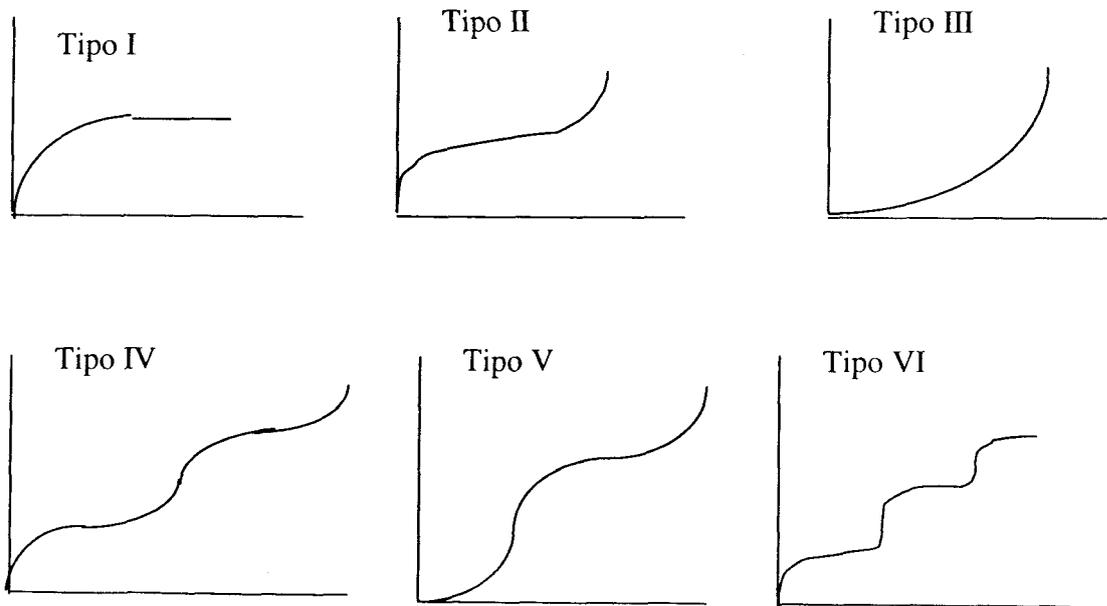
energía de activación y necesariamente está restringida a (al menos) una capa sencilla de adsorbato químicamente enlazado sobre la superficie. Ya que se forman enlaces químicos entre el adsorbato y un sitio específico sobre la superficie, el adsorbato se encuentra menos libre para migrar por la superficie.

La adsorción reversible o adsorción física es acompañada por bajos calores de adsorción con cambios estructurales que ocurren en la superficie. En este caso se cubre la superficie por más de una capa de adsorbato (al contrario de la química), entonces los poros pueden ser llenados por el adsorbato. Se lleva a cabo rápidamente ya que no se requiere energía de activación (como en la quimisorción). Una excepción es la adsorción en poros pequeños en donde la difusión puede limitar la tasa de adsorción. Las moléculas físicamente adsorbidas no están restringidas a sitios específicos y son libres de cubrir la superficie entera.

Las interacciones adsorbato-adsorbente que contribuyen a la adsorción son:

- Ion-Dipolo. Un sólido iónico y un adsorbato polar pero eléctricamente neutro
- Ion-Dipolo inducido. Un sólido iónico y un adsorbato polarizable
- Dipolo-Dipolo. Un sólido polar y un adsorbato polar
- Interacción de cuadrupolo. Moléculas simétricas con átomos de diferentes electronegatividades como el  $\text{CO}_2$  que posee un cuadrupolo que interacciona con superficies polares.

Brunauer, Deming, Deming y Teller (Lowell & Shields, 1991), encontraron que las isotermas de adsorción se ajustan a los siguientes tipos, graficando peso adsorbido vs presión relativa:



**Tipo I.** Se encuentra cuando la adsorción está limitada para al menos unas cuantas capas de moléculas. Esta condición se encuentra en la quimiosorción. Donde la asíntota se aproxima a una cantidad limitante que indica que todos los sitios de la superficie están ocupados. En el caso de la adsorción física, la isoterma tipo I se encuentra con polvos microporoso cuyos tamaños de poro no exceden unos cuantos diámetros moleculares del adsorbato.

A altas presiones los poros se llenan por adsorbato adsorbido o condensado produciendo una saturación, indicando una adsorción pequeña (o ausente) después de que los microporos se han llenado. La adsorción física que produce el tipo I indica que los poros son microporos y que la superficie expuesta reside casi exclusivamente dentro de los microporos los cuales una vez llenos con adsorbato dejan una pequeña superficie externa para la adsorción adicional.

**Tipo II.** Cuando la adsorción ocurre sobre polvos no porosos o con polvos de diámetros de poro mayores que microporos. El punto de inflexión de la curva ocurre cuando casi se ha completado la primera capa adsorbida y con un incremento en la presión relativa. La segunda y posteriores capas son completadas hasta saturación del número de capas adsorbidas se vuelve infinita.

**Tipo III.** Se caracteriza por calores de adsorción que son menores que el calor de licuefacción del adsorbato. Así, según ocurre la adsorción, se facilita la adsorción adicional porque la interacción del adsorbato con la capa adsorbida es mayor que la interacción con la superficie del adsorbente.

**Tipo IV.** Ocurren sobre adsorbentes porosos con radio de poro en el intervalo de 15- a 1000 Angstroms. La pendiente aumenta a presiones elevadas mayores lo que indica un aumento de consumo de adsorbato según se van llenando los poros. Igual que en las isotermas de tipo II, el quiebre en las de tipo IV generalmente ocurre cerca de que se ha completado la primera monocapa.

**Tipo V.** Resultan de potenciales de interacción adsorbato-adsorbente pequeños similares a los de las isotermas de tipo III. Sin embargo el tipo V está asociado también con poros en el mismo rango de aquéllas del tipo IV.

**Tipo VI.** Recientemente se ha encontrado un nuevo tipo raro de isoterma que presenta una serie de pasos.

### 1.5.2 Desorción de agua

Se entiende por secado la remoción de un líquido de un material por la aplicación de calor, y es acompañado por la transferencia de un líquido desde una superficie hacia una fase de vapor no saturado (Lachman, et.al. 1986). Existen métodos de secado no térmicos, es el caso de la desecación de humedad de un sólido colocándolo en un contenedor sellado con un material que remueve la humedad tal como sílica gel o una solución salina saturada. El secado reduce la reactividad química del agua remanente, lo cual se expresa como una reducción en la actividad del agua del material (Cheftel & Cheftel, 1976). Una curva típica de secado se representa en la Fig. 1.5.2.1 (Lachman, et. al. 1986).

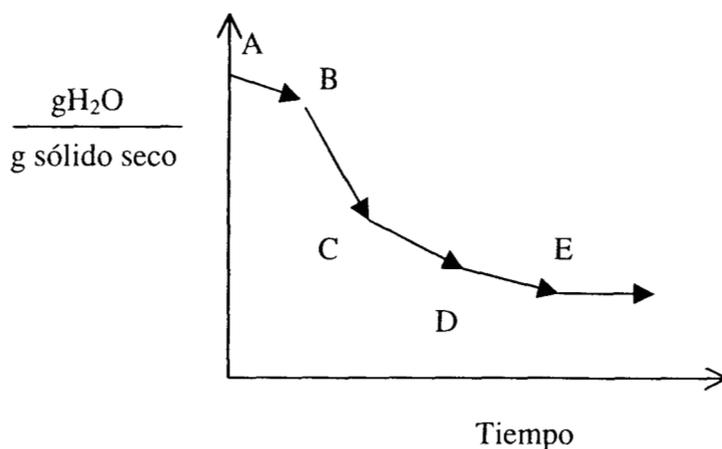


Figura 1.5.2.1. Curva típica de secado de un material sólido.

El segmento AB indica el enfriamiento del sólido hasta alcanzar la temperatura de bulbo húmedo; en B la temperatura se estabiliza y permanece constante mientras haya una película de humedad remanente en la superficie del material; en BC la humedad que se evapora en la superficie es reemplazada por el agua que difunde desde el interior del sólido, aquí la tasa de secado es constante; en C el agua superficial ya no es reemplazada con suficiente velocidad para mantener una película continua de agua, por lo que aparecen manchas de sequedad y la velocidad de secado comienza a disminuir (Contenido de humedad crítico); en CD crecen en número y área las zonas secas, la tasa de secado cae estacionariamente (Primer periodo de caída de velocidad); en D la película de agua superficial se ha evaporado completamente y la

tasa de secado depende de la tasa de difusión de humedad a la superficie, la caída de velocidad de secado es mayor (Segundo punto crítico, Segundo periodo de caída de velocidad); en E la tasa de secado es cero y su contenido de humedad permanece constante y en equilibrio con los alrededores. Una isoterma de sorción es la curva que indica la cantidad de agua retenida por un material en función de la humedad relativa de la atmósfera que lo rodea bajo condiciones de equilibrio y a una determinada temperatura. Entre los modelos teóricos, el más aplicado a alimentos es el de Brunauer, Emmett y Teller (isoterma BET), representada en la Fig. 1.5.2.2.

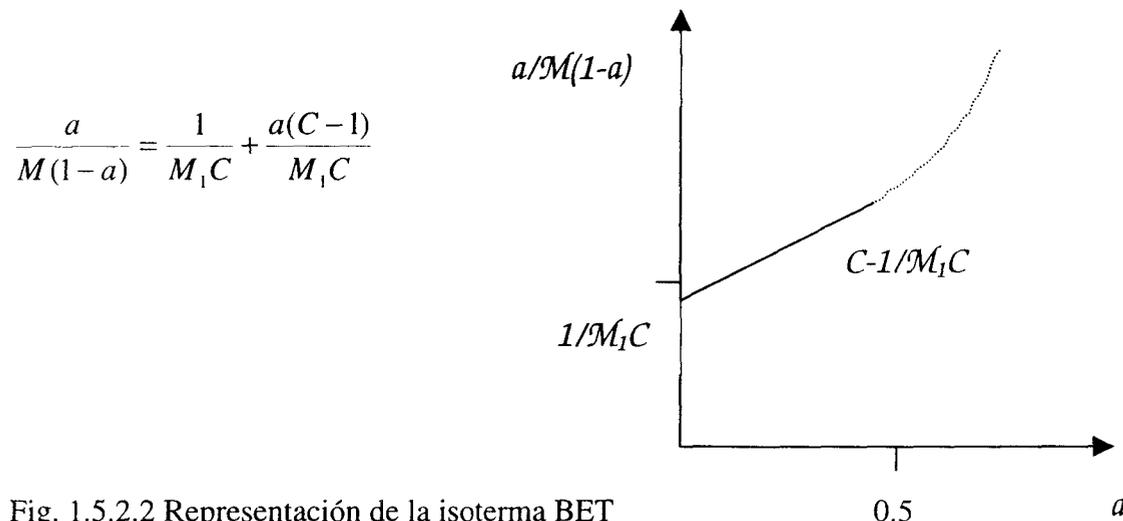


Fig. 1.5.2.2 Representación de la isoterma BET

donde

$a$  es  $A_w$

$M$  es el contenido de agua del producto (g / 100g materia seca)

$M_1$  es el contenido de agua correspondiente a la capa monomolecular

$C$  es una constante igual a  $k \cdot \exp(Q_s/RT)$ , donde  $Q_s$  es el calor de sorción.

Las isotermas de desorción se limitan en dos secciones, de agua fuertemente ligada y de agua débilmente ligada- agua libre. En la primera sección la  $A_w$  está entre 0 y 0.3, se encuentra una capa monomolecular fija a los grupos polares de las proteínas ( $\text{NH}_3^+$  y  $\text{COO}^-$ ) y de los grupos  $-\text{OH}$  de cadenas de carbohidratos.

En la segunda sección se encuentran capas sucesivas de agua cada vez más libre. En esta sección el agua presenta sus propiedades habituales de disolvente, casi no hay diferencia entre el agua débilmente ligada y el agua libre, se intercambian fácilmente entre sí (Cheftel & Cheftel, 1976).

### 1.5.3 Hidrofobicidad

Se ha sugerido que la tendencia global de los microorganismos para exhibir una superficie hidrofóbica está determinada por componentes de la superficie apolares y polares. En algunos microorganismos, los componentes de superficie que promueven la hidrofobicidad (hidrofobinas) y reducen la hidrofobicidad (hidrofilinas) parecen coexistir en la superficie celular. Por lo tanto su concentración relativa, su distribución, configuración y yuxtaposición es lo que determina la tendencia de la célula a presentar propiedades de superficie hidrofóbicas (Rosenberg & Doyle, 1990).

La mayoría de las células lleva una carga superficial neta negativa, su magnitud es afectada por el tipo de cepa, condiciones de crecimiento, pH y la presencia y concentración de varios iones inorgánicos. Aunque debería esperarse una correlación inversa entre la carga de superficie y la hidrofobicidad, a mayor carga de los grupos superficiales menor hidrofobicidad, entonces una célula puede tener ninguna o una pequeña carga neta superficial y estar cubierta por un gran número equivalente de moléculas cargadas positiva y negativamente, lo cual disminuye el efecto hidrofóbico. Otro de los elementos que confieren hidrofobicidad a las células son los apéndices llamados fimbrias, pero éstos también pueden conferirle electronegatividad que disminuye la hidrofobicidad (Rosenberg & Doyle, 1990).

Existen informes del efecto de diversos factores sobre la hidrofobicidad de células microbianas, tales como pH (Straver & Kijne, 1996), fuerza iónica (Bunt, et.al. 1995), agentes antimicrobianos (Jones, et.al. 1991), estadio de crecimiento (Rosenberg, et.al. 1980), sin embargo, la influencia del proceso de desecación únicamente se ha estudiado en sistemas complejos, con consorcios y soportes orgánicos tales como turba, composta y suelos (Valat, et.al. 1991; King, 1981; Bond & Harris, 1964; Emerson & Bond, 1962) en donde se establece que la repelencia al agua es causada por materiales orgánicos hidrofóbicos como hifas, ácidos húmicos y materia vegetal en descomposición.

Los ensayos para medir la hidrofobicidad de la superficie de la célula se dividen en dos grandes categorías. La primera categoría mide las propiedades hidrofóbicas de la superficie exterior de la célula como un todo. Tales ensayos incluyen CAM, Contact Angle Measurements (King, et. al. 1981), partición de las células en una y otra fase líquida TPP,

**225553**

Two-phase partition, y la adsorción de sondas moleculares individuales hidrofóbicas a la superficie de la célula (Straver & Kijne, 1996). La segunda categoría mide la hidrofobicidad en término de adhesión. Tales técnicas incluyen adhesión microbiana a hidrocarburos MATH, Microbial Adhesion to Hydrocarbons (Rosenberg, et. al. 1980), cromatografía de interacción hidrofóbica HIC, Hydrophobic interaction chromatography, y adhesión a poliestireno y otras superficies sólidas hidrofóbicas (Peñalver, et. al. 1996). Las técnicas como el SAT, Salt Aggregation Test (Jones, et. al. 1991), en las cuales se utiliza un agente salting-out para inducir la agregación de células en suspensión cae entre las dos categorías anteriores.

Cualquier medición de hidrofobicidad microbiana tiene dificultades técnicas inherentes. Las interacciones hidrofóbicas pueden promover la adhesión a un amplio rango de superficies e interfases, así, con frecuencia se encuentran microorganismos adheridos a las paredes de los recipientes de la prueba. Por otra parte, la mayoría de los ensayos de hidrofobicidad usan suspensiones acuosas, por lo que deben cuidarse a las propiedades de la fase acuosa, el tipo y concentración de sales, de amortiguadores y la presencia de contaminantes anfipáticos (componentes celulares liberados por las células mismas) puede tener un efecto en los resultados. Las bacterias con propiedades hidrofóbicas en su superficie tienden a adherirse unas a otras, resultando en una agregación. En algunos casos la adhesión de microorganismos a superficies hidrofóbicas es dependiente de densidad celular. Por último, las condiciones de crecimiento microbiano pueden afectar profundamente las propiedades de la superficie celular, por lo que debe ponerse atención a las condiciones de cultivo (Rosenberg & Doyle, 1990).

A la fecha no se han encontrado reportes sobre la hidrofobicidad de biopelícula formada en sistemas de biofiltración, existen sin embargo, trabajos sobre la hidrofobicidad de agregados celulares o lodos en sistemas para tratamiento de aguas residuales (Jorand, et. al. 1998), pero dadas las condiciones de completa inmersión en líquido de la biomasa, sus características no son comparables a biopelículas expuestas al aire.

## 2. ANTECEDENTES

Los métodos y técnicas analíticas de estudio de biopelículas proporcionan las herramientas básicas para obtener la información que se busca con la sensibilidad, precisión y exactitud deseadas. Algunos de esos métodos han sido aplicados a evaluar los efectos del contenido de humedad, actividad de agua y humedad relativa sobre sistemas de biopelícula.

### 2.1 Métodos empleados para caracterización de biopelículas

La caracterización de biopelícula por su composición y su actividad son dos parámetros importantes para la operación y control de procesos de biomasa fija. Los parámetros más usados para caracterización de biopelícula son grosor, peso seco total y cuenta total de células, además de aquéllos que describen la actividad biológica de biopelícula.

Los métodos para su caracterización son clasificados en tres categorías (Lazarova & Manem, 1995) según se esquematiza en la Tabla 2.1.1.

Tabla 2.1.1 Métodos para caracterización de biopelícula.

A. FORMACION Y ESTRUCTURA DE BIOPELICULA	Microscopía	De luz. De contraste de fases. CSLM, láser de barrido confocal SEM, de barrido de electrones TEM, de transmisión de electrones.
B. COMPOSICION DE BIOPELICULA	1. Biomasa Total 2. Componentes celulares 3. Componentes específicos: Carbohidratos Proteínas Lípidos	1. Peso seco, densidad, grosor, sólidos volátiles, espectrofotometría, turbidimetría, cuenta total celular. 2. Carbono orgánico total, demanda química de oxígeno. 3. Cromatografía de intercambio iónico y de capa delgada. Pirólisis. Espectrofotometría de masas. Colorimetría.
C. ACTIVIDAD BIOLOGICA	1. Cuantificación de moléculas indicadoras de actividad. 2. Medición de consumo de substratos. 3. Uso de microelectrodos.	1. Medición de actividad enzimática. Cuantificación de ATP y de ácidos nucleicos. Tinción de fluorocromos y análisis de imágenes. 2. Tasa de consumo de oxígeno. 3. Medición de O <sub>2</sub> , pH, sulfuro de hidrógeno.

## A. Formación de biopelícula y estructura

La estructura de la biopelícula es afectada por condiciones tales como el esfuerzo cortante al que es sometida, el tipo y concentración de sustrato disponible, además de la propia morfología celular: la estructura, rigidez y tasa de desprendimiento de biopelícula difiere según la capacidad de las cepas para formar microcolonias como capas homogéneas, o bien, colonias verticales.

Para examinar la formación y estructura de biopelícula, básicamente se utiliza la microscopía (CSLM, Confocal Scanning Laser Microscopy; SEM Scanning Electron Microscopy; TEM, Transmission Electron Microscopy), microscopía de luz, de epifluorescencia, de campo claro y de contraste de fases, en ocasiones junto con análisis de imágenes. Se pueden mejorar los resultados empleando diversas técnicas de tinción y de preparación de muestras. Las aplicaciones generales de la microscopía son :

- Primeras fases de formación de película, la adhesión de microorganismos al soporte
- Seguimiento del desarrollo de la película, formación de colonias como capas o columnas, de estructuras, canales, poros y espacios vacíos.
- Observar la formación y estructura de exopolímeros.

Las técnicas de microscopía de luz y microscopía electrónica son el método básico para investigaciones de estructura de biopelícula. La microscopía de luz es útil como paso preliminar proporcionando información sobre la apariencia general de la masa adherida, pero se puede obtener mejor información sobre la localización y distribución espacial de biopelículas delgadas con tinciones de INT (cloruro de 2-(p-iodofeni)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio) que permite la visualización de biomasa activa por su reacción con el sistema de transporte de electrones de la célula. Las principales ventajas de la microscopía de luz son la simplicidad, rapidez y posibilidad de observar la biomasa sin necesidad de un tratamiento preliminar. La resolución sin embargo es baja y cercana al límite de las dimensiones bacterianas  $0.345 \mu\text{m}/\text{pixel}$ .

El desarrollo de la microscopía láser de barrido confocal (CSLM) permite una observación en profundidad de la película mediante imágenes en 3 dimensiones lo que provee un puente entre microscopía de luz y microscopía electrónica. Utilizando esta técnica se ha demostrado una

clara diferencia en la estructura de agregados bacterianos como función de la concentración de calcio y la edad de la biomasa y con una distribución espacial no homogénea de células vivas y muertas marcadas por fluorocromos. Se ha demostrado la compleja estructura de películas aeróbicas formadas por agregados discretos de células densamente empacadas y espacios intersticiales.

Otra variante es la microscopía de barrido electrónico (SEM) que provee una resolución de imagen muy alta, puede acoplarse con el microanálisis de rayos X para determinar átomos elementales y la composición de la biopelícula. Algunos investigadores han observado y explican la presencia de proyecciones fibrosas como artificios resultado de las etapas de secado y fijación de la muestra. La mayor desventaja de la SEM es la lenta y compleja preparación de muestras la cual puede inducir al daño y distorsión de la biopelícula. El paso de secado de punto crítico puede comprimir las células reduciéndolas a un cuarto de su volumen. Información sobre la estructura interna de la biopelícula se puede obtener por medio de la microscopía de transmisión de electrones (TEM). Con esta técnica se han observado tres tipos de matrices de exopolímeros con diferentes propiedades físicas y distribución espacial.

Algunos autores (Siebel & Characklis, 1991) han utilizado el análisis de imágenes en microscopía de epifluorescencia para cuenta y medición de células bacterianas. Las ventajas son la rapidez y precisión del método. La mayor desventaja del análisis de imágenes acoplado a microscopía de campo claro y contraste de fases es su limitada aplicación a superficies transparentes.

Además de la microscopía, las mediciones con microsensores de la transferencia de masa de compuestos químicos marcados proporcionan información indirecta de la estructura de biopelículas.

## **B. Composición de la biopelícula**

La composición de la biopelícula es función de su edad y de las condiciones ambientales, se puede caracterizar por la biomasa total, por componentes celulares y por componentes específicos.

La cantidad total de biopelícula puede medirse por su masa, densidad o grosor, puede estimarse también por la medición de peso seco y de sólidos volátiles. La desventaja de estos

métodos es que incluyen organismos vivos, muertos, masa inerte, exopolímeros y materia orgánica absorbida. Específicamente para peso seco, existe un error de 6% por la higroscopicidad de las células bacterianas, además el contenido de materia seca puede ser dos veces más alto que lo asumido normalmente sin una corrección para el agua intercelular (38% en lugar de 20% para cultivos mixtos) según Harris & Kell (1985) referidos por Lazaroova, et. al. (1995).

Otros métodos para determinar biomasa son la espectrofotometría y turbidimetría, sin embargo, han sido ideados para biomasa en suspensión por lo cual se requiere un proceso previo de desintegración de la biopelícula. La masa celular en biopelícula puede ser estimada selectivamente por la cuenta total celular consistiendo de enumeración directa después de un paso preliminar de remoción de biomasa fija y disgregación de agregados. Algunas aproximaciones han sido usadas para la cuenta directa de células bacterianas.

La densidad de la biopelícula usualmente se calcula a partir de valores experimentales de biovolumen (grosor de biopelícula) y masa de biopelícula. Algunos investigadores han puntualizado la correlación entre el grosor de la biopelícula y la densidad. Han observado incremento en la densidad (arriba de 105 mg biomasa/cm<sup>3</sup>) durante los pasos iniciales de crecimiento de biopelícula la cual declina después de un grosor crítico de 100 micras hasta un valor relativamente estable de 25-30 mg biomasa/cm<sup>3</sup>. La densidad también puede estimarse conociendo la masa total y el grosor de la película, éste último se ha determinado con microscopía de luz, pero su exactitud es baja en particular para biopelículas delgadas y está limitado a películas homogéneas y planas.

El espesor de la biopelícula depende del volumen de la biomasa fija y varía durante su crecimiento. En la mayoría de los casos el desarrollo de la biomasa puede describirse por una curva sigmoideal, la asíntota representa el grosor crítico o estacionario de la biopelícula.

Con otras técnicas menos usadas puede obtenerse mayor precisión. Mediciones de conductancia eléctrica de biopelícula tienen una precisión de +/- 6%, pero su aplicación está restringida a superficies metálicas. El grosor de la biopelícula puede medirse indirectamente midiendo la resistencia térmica de la biomasa adherida.

Para la medición de material orgánico se cuentan con métodos fisico-químicos tales como la determinación de carbono orgánico total (TOC) y la demanda química de oxígeno (COD).

El TOC representa cerca del 50% de la biomasa celular, la sensibilidad y precisión de esta técnica es  $\pm 0.45 \mu\text{g C/cm}^2$ . Los resultados representan el contenido de bacterias más el contenido de carbono de exopolímeros.

Los factores de conversión o razón de carbono orgánico por peso seco de biomasa, varían considerablemente. Krambeck, et. al. (1981), Bakke, et. al. (1984), Turakhia & Characklis, (1989) referidos por Lazarova, et. al. (1995) han reportado 0.087, 0.1, 0.121, 0.165, 0.11, 0.5 mg C/mg peso seco; las diferencias se deben posiblemente a que se probaron diferentes microorganismos y a la presencia de agua intracelular no medida. Este efecto se considera corrigiendo el factor de conversión carbono orgánico/biovolumen a  $0.22 \text{ mgC/mm}^3$  (usualmente se usa 0.11) se recomienda un promedio de 0.2 para cultivos puros o mixtos.

Las medidas de materia oxidable representada por COD tiene una precisión más alta  $\pm 0.1 \mu\text{g O}_2/\text{cm}^2$  y un límite de detección bajo,  $6 \mu\text{g O}_2/\text{cm}^2$ ; el procedimiento es más complejo pero se simplifica usando equipo automatizado. Si se utiliza un factor de conversión de 0.706 mg peso seco/mg COD, se puede determinar la biomasa total de una biopelícula. Asumiendo que todo el material oxidable en el ensayo de COD fue carbón con número de oxidación de cero.

Básicamente, los componentes de biopelículas son células y exopolímeros. Se han enfocado varias investigaciones al estudio de la matriz extracelular, para determinar su contribución en la formación de biopelícula. Decho (1990) referido por Lazarova, et. al. (1985) ha estudiado las propiedades de los exopolímeros utilizando metodologías analíticas para extracción y caracterización de polisacáridos. Los métodos para identificación de monómeros incluyen cromatografía de intercambio iónico, de capa delgada, pirólisis combinada con espectrometría de masas, entre otros. El contenido total de carbohidratos puede estimarse por métodos colorimétricos que involucran el calentamiento de una muestra con ácido sulfúrico y la adición de un reactivo (antrona, carbazol o fenol) para desarrollar el color. El mecanismo de esos métodos es que el polisacárido es hidrolizado y reducido a compuestos de furfural que reaccionan con el reactivo específico para desarrollo de color.

Otro componente importante de la biopelícula es la proteína, se estima un valor promedio de 50% en varios cultivos bacterianos, también están presentes en la matriz extracelular, constituyendo arriba de 10-15% de la masa total. Han sido desarrollados métodos colorimétricos para el análisis de proteína total para la estimación de biomasa de cultivos

puros. McKinley & Vesta (1985), referidos por Lazarova, et. al (1985) compararon la efectividad de varios de ellos (método de Lowry, de Biuret, método azul de Bradford) aplicados a proteínas purificadas (albúmina sérica bovina, celulasa, peroxidasa,  $\beta$ -glucosidasa y lisozima) encontrando que el método de Lowry fue el más sensible y reproducible para determinación de proteína total y su respuesta fue menos variable para iguales cantidades de diferentes proteínas.

Dado que la pared y membrana celulares contienen lípidos y fosfolípidos, es posible cuantificar indirectamente la biomasa con su determinación, se requiere un proceso de lisis y extracción con solventes, seguido de análisis específicos para cada fracción; existen también métodos colorimétricos sensibles y reproducibles. La desventaja en este caso radica en el cambio en la concentración de lípidos bajo estrés fisicoquímico.

Actualmente con el desarrollo de la biología molecular, se han aplicado sus técnicas para dilucidar la composición de biopelículas *in situ*. Se han utilizado sondas específicas para localizar células únicas dentro de un cultivo mixto, anticuerpos marcados, sondas de oligonucleótidos fluorescentes, entre otros (Marshall, 1997). En biopelículas binarias se han usado anticuerpos unidos a fluoresceína para monitorear el proceso de colonización. Para biopelículas mixtas, se utilizan sondas de oligonucleótidos de las fracciones 16S y 23S del rRNA para detectar una bacteria particular dentro de la película y para medir su actividad (Pedersen, et. al. 1997). Otros autores han observado la diversidad genética en biopelícula de una población sulfato-reductora mediante un análisis de hibridación de los perfiles de la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) con sondas de oligonucleótidos específicas a un taxón (Santegoeds, et. al. 1998),

### C. Descriptores de actividad biológica

Las técnicas comunes para estimar la actividad biológica consisten en la medición de enzimas o productos específicos del metabolismo microbiano, otras utilizan tinciones específicas de moléculas presentes durante el crecimiento celular.

En el primer caso se encuentra la técnica para cuantificar ATP, es altamente sensible ( $1 \mu\text{g} \pm 10\%$ ) sin embargo, se requiere una extracción previa y es dependiente del estado fisiológico

de la célula, además, puede ser afectada por el cambio de poblaciones dentro del biofilm. La cuantificación de la actividad de deshidrogenasa tiene una precisión del 5%, es sensible y simple, pero también depende del estado fisiológico. Por su parte, la cuantificación de ácidos nucleicos que son proporcionales a la tasa de crecimiento celular, es en extremo sensible (0.5 ng/mL) al igual que compleja, por lo cual resulta más costosa; por lo general se mide DNA ya que su concentración varía menos que la de RNA. Se requiere un proceso de extracción y purificación, posteriormente se utiliza un método espectrofotométrico o fluorométrico para su cuantificación. Existen técnicas de introducción y seguimiento de radioisótopos.

Otro método de medición de actividad biológica es la tasa de consumo de oxígeno (OUR), aunque es simple, no es muy sensible ni es específico para bacterias.

La tinción de fluorocromos pertenece al segundo grupo, sus resultados son por análisis de imágenes. El fluorocromo más empleado es el anaranjado de acridina, éste fija específicamente para RNA y DNA y permite distinguir entre células activas (rojo-naranja fluorescente RNA) y células no activas (verde fluorescente DNA). Otra técnica para cuantificar células vivas utiliza el fluorocromo CTC, el cual es reducido por el sistema activo de transporte de electrones y entonces emite un rojo fluorescente bajo radiación UV .

Recientemente se han empleado microelectrodos para la medición de compuestos específicos, éstos permiten obtener perfiles sin alterar la estructura y funcionalidad de la biopelícula, además de dilucidar su estructura (Marshall, 1997, Villaverde, et. al. 1997). Los microsensores poseen agujas menores a 1 micra hasta 100  $\mu\text{m}$  y han sido empleados para medir concentraciones de oxígeno, sulfuro de hidrógeno y pH (Santegoeds, et. al. 1998).

## **2.2 Estudios previos del efecto del agua en la operación de biofiltros**

Se han realizado diversas investigaciones sobre el efecto del contenido de humedad, la actividad de agua y la humedad relativa en la operación de biofiltros y, por tanto, estudios indirectos de su efecto sobre la fase biológica. A continuación se mencionan algunas de ellas. Algunos autores (Thompson, et. al. 1996) han observado que la tasa de adición de agua requerida para mantener una eficiencia de remoción de contaminantes aceptable (mayor al 80%) es mayor a la estimada en principio y que el empleo de la humidificación de aire no es

suficiente para mantener eficiencias de remoción adecuadas. Los autores emplean un reactor escala piloto ( $0.9 \text{ m}^3$ ) con composta como medio filtrante para la eliminación de BTEX. Evalúan su operación durante un año y observan eficiencias mayores a 80%. De sus observaciones concluyen que la adición de agua es un factor fundamental para la eficiencia de remoción en el biofiltro.

Otros autores (Pedersen, et. al. 1997) han estudiado el efecto del crecimiento de biopelícula sobre la transferencia de masa en la fase gas-líquido. El análisis se realizó en un biofiltro percolador para la remoción de MTBE y de Tolueno. Estos autores encuentran que el coeficiente de transferencia de masa en líquido  $K_{La}$  es 25-140% mayor en el material con formación de biopelícula; consideran que ese resultado puede deberse a una superficie mejor humedecida y por tanto una mayor área de transferencia de masa.

En otro aspecto, como opciones para el diseño de biofiltros, algunos autores (Van Lith, C., et. al. 1997) han incluido como factor fundamental el balance de humedad, dentro de éste consideran el proceso de prehumidificación del aire influente, el secado del soporte por biooxidación exotérmica de los contaminantes, el intercambio de calor con el medio ambiente y la degradación del medio filtrante orgánico. A su vez, analizan diversas opciones para el control de la humedad, estableciendo como procesos básicos el control *Ad-hoc*, el control manual, el control semiautomático y el control automático, todos ellos en función del tipo de biofiltro empleado.

Se han realizado estudios (Ostlie-Dunn, et. al. 1998) sobre el consumo de agua en biofiltros percoladores de lecho textil. Estos investigadores emplearon como soportes fibras de poliaramida y nylon preformadas para la remoción de etil acetato, estireno, tolueno y m-xileno. Proponen dos mecanismos para el control de crecimiento microbiano: la temperatura del sistema y la disponibilidad de agua. Observan que el contenido de humedad en la biopelícula resulta fundamental, cuando ésta se encuentra saturada de agua provoca un aumento en la caída de presión y posibles zonas anaeróbicas y por el contrario, cuando la biopelícula tiene bajo contenido de humedad, la actividad microbiana disminuye o cesa. Cuando el suministro de agua disminuye la capacidad de eliminación aumenta notoriamente para compuestos hidrófobos como tolueno y xileno. Señalaron también que la biopelícula

presentó tolerancia a la desecación, sin embargo, no fundamentan su comentario con un informe de resultados.

Investigaciones sobre el efecto de la adición de amoníaco gaseoso en un biofiltro empacado con turba para la eliminación de tolueno (Morales, et. al. 1998), muestran una capacidad de eliminación máxima inicial de  $190 \text{ g/m}^3/\text{h}$ , tras una primera adición de amoníaco ésta se reduce a  $80 \text{ g/m}^3/\text{h}$  y después de una segunda adición se reduce a  $40 \text{ g/m}^3/\text{h}$ . Los autores mantienen el proceso de biofiltración sin adición de agua con objeto de analizar el efecto de secado del medio filtrante en la capacidad de eliminación mediante balances de masa y calor durante el proceso; asocian la disminución en la capacidad de eliminación al proceso de secado, aunque quedan dudas sobre el efecto de la humedad que es retenida por el material filtrante sobre la biopelícula.

Han sido dirigidos estudios hacia la caracterización física, química y biológica del medio soporte filtrante en un biofiltro a gran escala para remoción de COV (Cárdenas-González, et. al., 1998), con el objetivo de establecer la necesidades de cambio en la operación del biofiltro y reemplazo del medio filtrante. En dichos trabajos se realizaron diversos análisis al soporte y los investigadores encontraron que el contenido de humedad fue altamente variable en el lecho y asociaron este fenómeno con valores de pH y de consumo de oxígeno bajos. Particularmente observaron la formación de agregados con gran cantidad de micelio y de difícil rehumectación, con lo cual se establece una posible relación entre el estado de la biopelícula en el biofiltro y la posibilidad de recuperar la actividad biológica mediante rehumectación del soporte.

Se han realizado investigaciones sobre la evaluación de soportes para inmovilización de bacterias, comparando su operación durante estrés por carga elevada, por choque ácido, por choque térmico y estrés por secado (Heitkamp, et. al. 1993). Los autores emplearon como soportes de estudio tierra de diatomeas, bioacarreadores con nanoporos (esferas de vidrio), y acarreadores orgánicos que tienen propiedades de adsorción (carbón activado granular) con diferentes porosidades. El inóculo fue una cepa de *Pseudomonas* degradadora de p-nitrofenol (PNF) y se alimentó un desecho sintético con 100 a 1300 mg/L de PNF. En el caso del reactor empacado con carbón activado se observó una tolerancia excepcional al choque por calor, manteniendo una tasa de remoción de PNF mayor a 85% durante todo el estudio. Los otros

acarreadores mostraron casi completa pérdida de degradación de PNP durante las perturbaciones excepto en el secado, pero todos recobraron altas tasas de degradación 24 h después del choque por secado.

La influencia del contenido de agua y la actividad de agua ( $A_w$ ) sobre la degradación de estireno en biofiltros ha sido investigada (Cox, et. al. 1996). Estos autores estudiaron el desarrollo del biofiltro con baja disponibilidad de agua empleando el hongo *Exophiala jeanselmei* cultivado sobre perlita. Este organismo degrada estireno en condiciones de baja actividad de agua (0.91 a 1). En sus biofiltros la capacidad de eliminación de estireno con  $A_w$  0.91 fue 5% de la máxima capacidad de eliminación con  $A_w$  1 ( $79 \text{ g/m}^3/\text{h}$ ). Los autores observaron que la aplicación de aire seco resultó en una rápida pérdida de la actividad de degradación de estireno, aún con un contenido de agua en el lecho de 40-60% w/w y  $A_w$  1. En este trabajo se puntualiza la necesidad de la humidificación del gas y el suministro adicional de agua para mantener una capacidad de eliminación elevada y estable.

Algunos investigadores han realizado estudios sobre la influencia del contenido de agua inicial en la tasa de degradación de etanol en biofiltros (Auria, et. al. 1998). Dichos estudios se realizaron en biofiltros de turba con diferentes contenidos de agua iniciales (70, 59, 49, y 35%). Para contenidos de agua en el intervalo de 49 a 70%, la capacidad de eliminación fue alrededor de  $30 \text{ g/m}^3/\text{h}$ . Para contenido de agua de 35%, la capacidad de eliminación disminuyó a  $4 \text{ g/m}^3/\text{h}$ . Los autores observaron que cuando el material de empaque fue secado de 70 a 59% de contenido de agua durante el proceso de biofiltración, la capacidad de eliminación disminuyó de  $27 \text{ g/m}^3/\text{h}$  a  $4 \text{ g/m}^3/\text{h}$ . Después de 24 h de secado el experimento fue iniciado nuevamente y operado durante 2 semanas, sin embargo, durante este periodo el biofiltro no recuperó su capacidad de eliminación. Los autores realizaron balances de masa para determinar las tasas de evaporación así como de producción de agua. Cabe mencionar que el procedimiento para recobrar la capacidad de eliminación del biofiltro en esta investigación consistió únicamente en aumentar la humedad relativa del aire influente, es posible que con otros métodos de rehumectación del soporte se obtengan resultados más favorables.

Investigaciones sobre la dinámica del contenido de agua en biofiltros han sido realizadas por otros autores como Gostomski, et. al. en 1997. Los autores analizaron el papel de la humedad

y la generación del calor microbiano en el proceso, aplicando para ello balances de masa y energía sobre un biofiltro de composta, así identificaron mecanismos para el cambio de contenido de agua en el lecho: fluctuaciones de humedad en la entrada y en la salida del reactor, generación de calor por la oxidación microbiana, y gradientes en el potencial de agua. Observaron que los mecanismos dominantes fueron la oxidación microbiana y las fluctuaciones de humedad para los cambios en el contenido de agua. En los experimentos observaron un frente móvil de temperatura y evaporación de agua, el cual fue asociado a la biooxidación de tolueno. La generación microbiana de calor localizada, evaporó suficiente agua de secciones consecutivas del lecho y eventualmente impidió la degradación a través de la toda la columna.

También se han llevado al cabo estudios sobre el efecto de la humedad relativa del aire en la adsorción de diferentes COV así como la influencia del tipo de sorbente (Ruiz, et. al. 1998). En dichos estudios se determinaron las isotermas de adsorción de gases orgánicos volátiles de diferentes propiedades sobre suelos minerales con diferentes características. Se analizó la adsorción de siete compuestos orgánicos (n-hexano, n-heptano, n-octano, tolueno, xileno, etilbenceno, y metil etil cetona) y de vapor de agua sobre arena, arcilla y limo. Se examinó la influencia de la presencia de agua sobre la adsorción de esos compuestos, trabajando a niveles menores del límite de la aplicabilidad de la ley de Henry. Los niveles de humedad relativa del aire probados fueron 20 y 50%. Los autores observaron que el agua disminuye la adsorción de COV afectando a una mayor cantidad de compuestos aromáticos y alifáticos que compuestos polares.

Aunque los biofiltros pueden ser operados sin problemas durante años, la principal dificultad dentro de los procesos de operación es mantener el contenido de agua apropiado en el lecho, dicho material no está saturado normalmente y el agua no fluye libremente. Por lo cual el contenido de agua es difícil de ajustar o determinar en línea.

El contenido de agua afecta la biología y la física del sistema. Agua en exceso produce elevadas caídas de presión conforme desplaza el aire en los espacios interpartícula, por tanto, restringe el flujo del aire y se crean zonas anaerobias, aunado a esto, disminuye la disponibilidad de compuestos hidrófobos para el microorganismo por la oposición a la

transferencia de masa, todo en conjunto afecta negativamente la transformación de los compuestos contaminantes.

Por el contrario, la deficiencia de agua afecta la actividad biológica, limita la eliminación de metabolitos de excreción y el suministro de nutrientes solubles. El contenido de agua idóneo dependerá del sistema: microorganismo-soporte-tipo de contaminante a degradar. Se ha evaluado un sistema de biofiltración con turba para remoción de tolueno con diferentes contenidos de agua, encontrando la máxima remoción a 60% (Acuña, et. al. 1999).

Con base en los hechos mencionados, se establece la necesidad de realizar estudios del efecto del contenido y actividad de agua en la biopelícula sobre su actividad biológica medida como capacidad de eliminación de contaminantes, todo ello en sistemas modelo que permitan un correcto control de las variables involucradas.

Como se ha descrito anteriormente, las diversas investigaciones y estudios sobre el contenido de humedad, la actividad de agua y la humedad relativa en sistemas para biofiltración de aire contaminado, se han llevado al cabo empleando soportes particulados y/o orgánicos, tales como composta, turba, tierra de diatomeas, carbón activado granular, entre otros, los cuales retienen un volumen de agua, ésto aunado a las mediciones de, únicamente, la capacidad de eliminación en la operación de los biofiltros, mantienen las interrogantes sobre los efectos físicos, químicos y biológicos que tienen las moléculas de agua en sus diferentes fases sobre la fase biológica de los biofiltros, es decir, sin la influencia del soporte y directamente sobre la biopelícula. Para lograr medir y cuantificar esos efectos es necesario utilizar métodos y técnicas de caracterización de biopelícula que sean aplicables o sean susceptibles de adecuarse a sistemas de biofiltración de aire. Al respecto podrían mencionarse como determinaciones básicas, las de biomasa, aspecto microscópico, así como la medición de la actividad biológica de biopelícula, sin dejar a un lado algunas mediciones físicas útiles para estos sistemas, tales como adsorción de compuestos volátiles, desorción de agua e hidrofobicidad.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto del secado en las propiedades físicas y biológicas de la biopelícula formada sobre un soporte sintético.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Establecer las técnicas para caracterizar física y biológicamente una biopelícula formada sobre un soporte sintético
- Evaluar el efecto del contenido de humedad sobre las propiedades físicas y de actividad biológica de la biopelícula

## 4. MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental se llevó al cabo en el Laboratorio de Emisiones Gaseosas del CyTAMB en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, durante el periodo de enero de 1999 a abril del 2000.

### 4.1 Inóculo

Se utilizó un cultivo mixto adaptado para degradar tolueno obtenido de un consorcio de un biofiltro percolador para tratamiento de thinner (tolueno, isopropanol y etil acetato), provisto por el Lab. Emisiones Gaseosas de la UAM Iztapalapa (Acuña, et. al. 1999).

La preparación del inóculo para la formación de biopelícula se realizó como sigue:

1. Se sembraron por estría 5 cepas bacterianas sobre agar nutritivo (2c, tol3bf, Bv, tol3b y *Pseudomonas fluorescens*) y 2 cepas de levadura (BS3 y BS4) sobre agar Saboureaud. Se emplearon tubos de ensaye de 1.5 cm de diámetro y 10 cm de largo con tapones de algodón. Se incubaron por 48 h a 29-30°C.
2. El crecimiento sobre las cuñas de agar se cosechó con 3 mL de medio mineral o solución isotónica estériles. Alícuotas de 2 mL de la suspensión de células de cada cepa se sembraron juntas en 300 mL de medio mineral contenido en un matraz erlenmeyer de 1000 mL. El matraz se incubó con agitación 200 rpm por 72 h a 29-30°C (New Brunswick Scientific, NJ USA). La fuente de carbono adicionada fue 300 ppm de tolueno por día.
3. El medio mineral empleado para la propagación del inóculo se muestra en la Tabla 4.1.1. (Acuña, et. al. 1999).

Tabla 4.1.1. Composición del medio mineral para propagación de inóculo y formación de biopelícula.

NUTRIENTE	CANTIDAD
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0.4

4. El inóculo para los reactores de biopelícula se estandarizó preparando una suspensión de células de densidad óptica de 0.2 a 540 nm (Spectronic 20D. Milton Roy Company, NY USA) empleando como blanco agua.

#### 4.2 Equipo para formación de biopelícula tipo biofiltro percolador

Para la formación de película tipo biofiltro percolador se emplearon soportes sintéticos en placas de 1.5 x 7.0 cm de acero inoxidable 430, polipropileno y vidrio, a fin de probar superficies con diferente rugosidad, hidrofobicidad y capacidad de adsorción tanto de compuestos volátiles como de bacterias.

Las placas se colocaron en forma horizontal sobre una rejilla fabricada en acrílico. La rejilla se colocó dentro del reactor, las dimensiones de éste fueron 30 x 30 x 30 cm, construido en acrílico, su volumen útil de operación fue 5.4 L.

Se hizo recircular la mezcla de inóculo y medio mineral cada 30 min. durante 8 días. Se utilizó una bomba de aire para suministrar oxígeno al cultivo líquido y al cultivo fijo. El reactor se mantuvo a 30°C en un cuarto de temperatura controlada.

En la Fig. 4.2.1 se muestra el reactor para formación de biopelícula y un esquema de su funcionamiento.

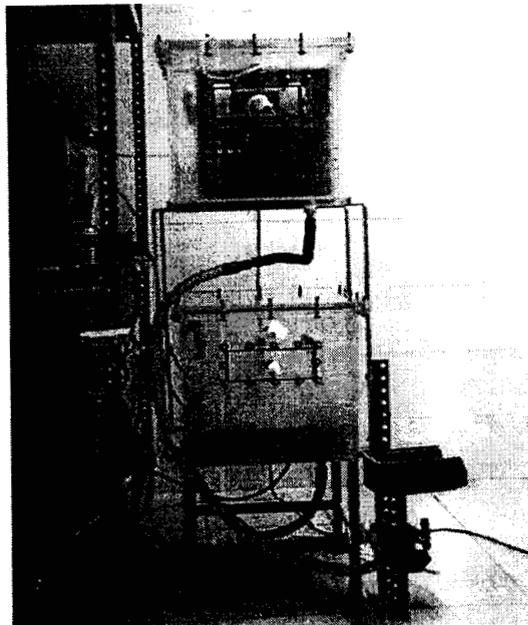
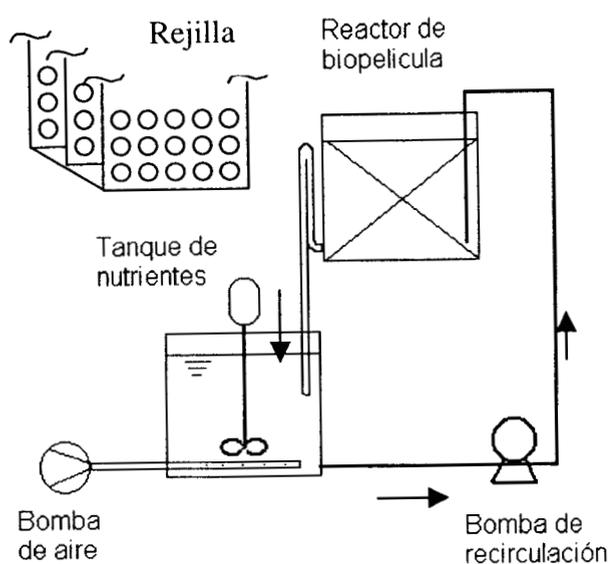


Figura 4.2.1. Reactor para la formación de biopelícula y su esquematización.

### 4.3 Condiciones de cultivo

Para la formación de biopelícula se empleó como inóculo una suspensión celular de 5 bacterias y 2 levaduras con densidad óptica 0.2 a 540 nm.

El medio nutritivo suministrado fue el descrito en la Tabla 4.1.1, adicionando como fuente de carbono 1.37 g/L/d de dextrosa como fuente de carbono de fácil asimilación. Se ajustó el pH del cultivo a 7 diariamente con NaOH 1N. Este fue medido con un potenciómetro (Conductronic pH 20, México).

La temperatura para el crecimiento de biopelícula fue aproximadamente 29°C, esto se logró colocando el reactor en el interior de un cuarto con temperatura controlada.

El suministro de oxígeno se efectuó empleando una bomba de aire (Máxima) con flujo mínimo de aire 2800 cc/min por dos salidas, una de ellas para el cultivo líquido y la otra dirigida al cultivo fijo. La agitación del cultivo líquido se llevó a cabo con el mismo burbujeo del suministro de oxígeno.

#### **4.4 Técnicas para análisis biológico de biopelícula**

Las técnicas empleadas para el análisis biológico de la biopelícula fueron mediciones de biomasa, con objeto de normalizar algunos resultados, mediciones de respirometría, a fin de medir la actividad biológica bajo diferentes condiciones de humedad, y observaciones del aspecto microscópico de la biopelícula sobre diferentes soportes.

##### **4.4.1 Mediciones de biomasa**

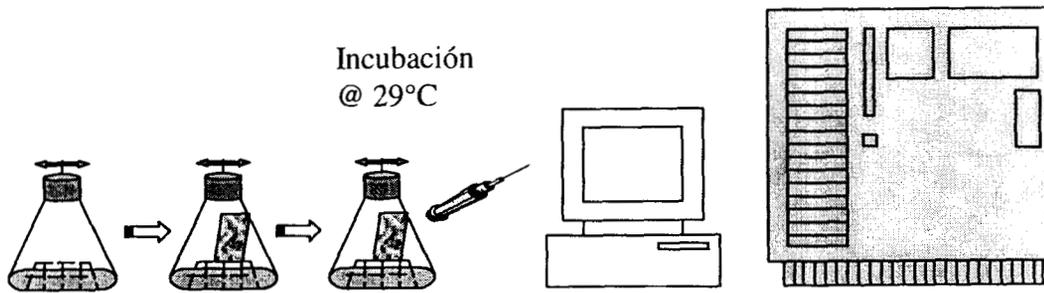
Las mediciones de biomasa se realizaron en el cultivo suspendido de recirculación y en la biopelícula formada sobre las placas de acero inoxidable. Se empleó como técnica básica el método de Lowry para determinación de proteína (Anexo 8.2), y como técnicas de apoyo mediciones de densidad óptica y de peso seco. La toma de muestras fue diaria para el cultivo en suspensión y únicamente al final de la fermentación para el cultivo fijo.

Para determinar la biomasa fija producida, se realizó un procedimiento previo de extracción. Empleando una espátula de teflón, se rasparon las placas de soporte inmersas en 20 mL de amortiguador PUM (Anexo 8.1), la suspensión de biopelícula se homogenizó con un homogenizador control de potencia 50 por 30 segundos (Ultra-Turrax, Ika-werk OH USA), de esa suspensión se tomaron alícuotas para las mediciones correspondientes.

Con objeto de contar con resultados que respaldaran los obtenidos con la técnica de Lowry, se empleó un método espectrofotométrico para medir biomasa. La densidad óptica de la suspensión celular homogenizada se leyó a 540 nm (Spectronic 20D. Milton Roy Company), empleando como blanco agua destilada.

Otra técnica de apoyo para determinar biomasa fue su medición por peso seco, los soportes de acero inoxidable se llevaron a peso constante, la placa con biomasa adherida se secó por 8 h a 110°C, y el peso seco de la biomasa adherida se calculó por la diferencia de los dos primeros.

#### 4.4.2 Mediciones de respirometría



Solución salina + Malla inoxidable      Biopelícula sobre soporte + Tolueno y Aire      Incubación @ 29°C      Monitoreo del consumo de substratos

La actividad microbiana fue evaluada por la tasa de degradación de tolueno en ambientes cerrados. Los experimentos se llevaron a 29°C en frascos erlenmeyer de 125 mL (volumen real entre 130 y 155 mL) tapados con válvulas mininert (VICI Precision Sampling Inc., Baton Rouge, LA). En ellos se introdujo una malla de acero inoxidable y sobre ésta, la placa con biomasa adherida para evitar el contacto con la solución reguladora de humedad relativa dentro del frasco. El control de la humedad relativa dentro de los frascos se obtuvo colocando 5 mL de diversas soluciones salinas saturadas (Anexo 8.1) para el porcentaje de humedad relativa indicado.

Posteriormente se inyectaron 5 µL de tolueno líquido puro con jeringa de 10 µL para alcanzar una concentración inicial en la fase gaseosa de aproximadamente 30 g/m<sup>3</sup>. No se adicionó una fuente suplementaria de carbono y se siguió el consumo de tolueno. Se realizaron experimentos simultáneos sin tolueno para cuantificar la respiración endógena. Para determinar la adsorción de tolueno sobre los materiales del sistema incluyendo la biopelícula se realizaron isotermas de adsorción de tolueno sobre cada material seco.

Con el propósito de verificar el estado de equilibrio entre la atmósfera de humedad relativa controlada y la biopelícula, se realizaron adiciones sucesivas de tolueno, en estos casos los frascos fueron aireados antes de cada nueva adición de tolueno.

El tolueno, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> se determinaron periódicamente de la fase gaseosa de cada frasco. En algunos casos, cuando la desecación de biopelícula fue menor, se utilizó el modelo integrado de Gompertz, para analizar la cinética de los datos de consumo de tolueno (Acuña, et. al. 1999).

En este modelo logístico las concentraciones de consumo de tolueno, Sc puede expresarse como una función del tiempo de acuerdo a la siguiente ecuación

$$Sc = \alpha \exp (-\beta e^{-\kappa t})$$

Donde

Sc es substrato consumido = (So – S), substrato inicial menos substrato final

$\alpha$  (g tol/m<sup>3</sup>) es la máxima concentración de tolueno consumida

$\beta$  es un parámetro relacionado a las condiciones iniciales

$\kappa$  (h<sup>-1</sup>) es la tasa de consumo de tolueno

Los valores  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$  se estimaron a partir de los datos experimentales usando un ajuste de regresión no lineal. La velocidad máxima de consumo volumétrico de tolueno Vmax, puede ser calculada a partir de los parámetros del modelo como  $V_{max} = 0.368 \alpha \kappa$ . Esta velocidad en g Sto/m<sup>3</sup>/h puede expresarse como velocidad específica de consumo de substrato al dividirse entre el peso de la biomasa.

Para el análisis de las atmósferas dentro de los frascos, se tomaron muestras de 100 $\mu$ L con jeringas para gases y se inyectaron directamente al cromatógrafo de gases. Para tolueno se utilizó un cromatógrafo con detector de ionización de flama, FID (HP 5890 Serie II, Hewlett Packard Co., Avondale PA) equipado con una columna de 5 metros HP-1 Megabore (Hewlett Packard Co., Avondale PA). La temperatura del puerto de inyección, del horno y del detector fueron 150,120 y 210°C respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con flujo de 1.5 mL/min. Las concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se evaluaron simultáneamente en un TCD-GC (Gow-Mac Instrument Co., Madison, NJ) equipado con una columna concéntrica (CTR-1, Alltech, EUA). Las condiciones de operación fueron 70°C para el inyector, 30°C para el horno, 60°C para el detector. Se utilizó helio como gas acarreador con flujo de 65 mL/min.

**225553**

#### **4.4.3 Observaciones microscópicas**

Las observaciones del aspecto microscópico de la biopelícula sobre acero inoxidable, polipropileno y vidrio se realizaron empleando microscopía de barrido electrónico y microscopía de contraste de fases.

Para la primera, las muestras del biopelícula sobre los distintos soportes se fijaron en una solución de glutaraldehído. Se lavaron con el mismo amortiguador y fueron postfijadas en amortiguador de fosfatos conteniendo  $\text{OsO}_4$ . Posteriormente, se deshidrataron gradualmente con soluciones de agua-acetona (30-100%) (Anexo 8.3). Las muestras se secaron en un secador de punto crítico (Samdri-780 B, Tousimis Research Corp., Rockville MD) empleando  $\text{CO}_2$  y finalmente, fueron cubiertas con oro. La examinación se llevó a cabo en un microscopio de barrido electrónico digital (JSSM-5900 Japan) usando 8 kV y amplificaciones hasta de 14000X.

Las observaciones en el microscopio de luz se realizaron con muestras frescas de biopelícula usando los objetivos para 40X y 100X de un microscopio de contraste de fases HFX-DX Nikon y las fotomicrografías se tomaron en un microscopio estereoscópico SMZ-2T Nikon, Japan empleando una cámara FX-35DX, Nikon, USA.

#### **4.5 Técnicas para análisis físico de biopelícula**

Los análisis físicos de biopelícula consistieron en mediciones de hidrofobicidad de las células constituyentes de la biopelícula, a fin de evaluar el efecto de desecación sobre la misma, en la obtención de isothermas de adsorción sobre biopelícula seca para determinar la disminución de tolueno por condiciones abióticas, en la determinación de isothermas de desorción de agua de la biopelícula para obtener un perfil del proceso de desecación, y como técnica de apoyo se realizaron mediciones de actividad de agua.

#### 4.5.1 Índice de hidrofobicidad por partición en fase orgánica

El método empleado se fundamenta en la naturaleza hidrofóbica de la superficie más externa de células microbianas y la partición celular que ocurre en un sistema líquido de fase acuosa:fase orgánica, de esta manera, la disminución de la absorbancia de la fase acuosa por el paso de células a la fase orgánica es una medida de la hidrofobicidad la superficie celular (Rosenberg, et. al. 1980).

Las mediciones de hidrofobicidad se efectuaron sobre biomasa suspendida del cultivo de recirculación y sobre biomasa adherida a los soportes.

La biomasa se lavó con amortiguador PUM (Anexo 8.1), pH 7.1, se midió la absorbancia ( $A_o$ ) de la suspensión celular a 540 nm en espectrofotómetro (Spectronic 20D. Milton Roy Company) empleando como blanco el amortiguador. Se adicionaron 3 mL de tolueno a 3 mL de dichas suspensiones en celdillas de espectrofotómetro de 10 cm diámetro y se agitaron en vórtex (Super Mixer. Lab-line Instruments, Inc. Melrose Parl ILL) en el nivel 5 durante 60 s. Se dejaron separar las fases durante 15 min y se determinó la absorbancia final ( $A_f$ ) a 540 nm de la suspensión celular en la fase acuosa.

En el caso de la biomasa fija, ésta se recuperó previamente de las placas de material sintético, sumergiéndolas en amortiguador PUM y raspando con una espátula de teflón.

El cálculo del índice de hidrofobicidad se realizó con la fórmula

$$\text{Índice de Hidrofobicidad} = \frac{A_f}{A_o}$$

Donde

$A_f$  es la absorbancia final de la fase acuosa,

$A_o$  es la absorbancia inicial de la fase acuosa.

De manera que un valor de 1 implica nula hidrofobicidad. Las mediciones se realizaron por triplicado.

#### **4.5.2 Isoterma de adsorción de tolueno en biopelícula**

Para la obtención de la isoterma de adsorción de tolueno en biopelícula, se extrajo la biomasa de las placas de material sintético y se dejó secar por 24 horas en estufa a 70°C, posteriormente se mantuvo en un desecador. Se homogeneizó el tamaño de partícula en un mortero de porcelana, se colocaron pesos ascendentes de la biomasa seca en frascos erlenmeyer de 250 mL, se inyectaron 200 µL de tolueno líquido y fueron tapados con válvulas mininert. Para alcanzar el equilibrio en las atmósferas de los frascos, se mantuvieron en incubadora a 30°C por al menos 48 h. A continuación, se tomó una muestra de 0.1 mL con jeringa de 0.5 mL para gases y se inyectó directamente en el cromatógrafo de gases para medir la concentración de tolueno en la fase gas, según se describió en el ensayo de respirometría.

El cálculo de la cantidad de tolueno adsorbido sobre la biomasa se obtuvo restando la concentración de tolueno medida en la atmósfera del frasco de la concentración teórica de tolueno adicionada. Las mediciones se realizaron por duplicado. Se graficaron los gramos de tolueno adsorbido por gramo de biomasa contra la concentración de tolueno en la fase gas.

#### **4.5.3 Isoterma de desorción de agua en biopelícula**

Las isotermas de desorción de agua en biopelícula se obtuvieron a partir de muestras frescas. Las placas con biomasa adherida tomadas recientemente del reactor, o bien, de los frascos con humedad relativa controlada, se colocaron en el plato de una balanza analítica (Ohaus Galaxy 160, USA) y se registró su peso cada minuto. Posteriormente, se restó el peso del soporte y se graficó la disminución de peso de la biopelícula en el tiempo.

#### **4.5.4 Actividad de agua de biopelícula**

Las mediciones de actividad de agua en la biopelícula se realizaron con el propósito de verificar el equilibrio de la biopelícula con la atmósfera de humedad relativa controlada. Para ello, se colocaron muestras de biopelícula sobre placas de soporte de 1.5 x 1.5 cm en frascos conteniendo diversas soluciones salinas saturadas (Anexo 8.1), se incubaron por 24 y 72 h a

30°C y se midió la actividad de agua ( $A_w$ ) en un AquaLab CX-2 (Decagón Devices Inc., Pullman, WA). Las mediciones se realizaron por duplicado.

#### **4.6 Diseño de experimentos y análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron aplicando el paquete SPSS y Microsoft Excel 2000. Todos los análisis y pruebas se efectuaron con un nivel de significancia 0.05.

La validación del sistema para formación de biopelícula se efectuó con un análisis de varianza de dos factores, posición horizontal (frente, medio, atrás) y vertical (superior, inferior), para la biomasa adherida medida como  $\text{mg proteína/cm}^2$ . Se tomaron las muestras completamente al azar, 12 placas colonizadas para el factor posición horizontal y 18 placas para el factor posición vertical.

En el experimento de actividad biológica se tomó una placa para cada porcentaje de humedad relativa probado y se hicieron duplicados, así sacaron 10 placas completamente al azar de las 60 placas que se colocaron en el reactor. Las constantes cinéticas del modelo de Gompertz se compararon con un análisis de varianza de un factor.

Los ensayos de hidrofobicidad se realizaron de forma análoga, 1 placa para cada nivel de humedad relativa por duplicado. Posteriormente se compararon los resultados del efecto del nivel de desecación en el índice de hidrofobicidad un análisis de varianza de un factor para probar que existe al menos un nivel de humedad relativa que produce un índice de hidrofobicidad diferente. Se analizó también el efecto del sustrato, glucosa y tolueno, sobre el índice de hidrofobicidad mediante una prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales para probar que la media muestral de la hidrofobicidad de células creciendo en glucosa difiere de la hidrofobicidad de células creciendo en tolueno. Finalmente se analizó el efecto del soporte sobre dicho índice con una prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales para probar que la media muestral de la hidrofobicidad de biopelícula sobre polipropileno difiere de la hidrofobicidad de biopelícula sobre acero inoxidable y que ambas difieren de aquella medida en biomasa suspendida de recirculación.

Los puntos para la isoterma de adsorción se obtuvieron por duplicados para cada nivel de humedad relativa probado, calculando la media y desviación estándar.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

En un principio se utilizó un reactor proptotipo (RP) para la formación de biopelícula con objeto de ajustar algunos parámetros de control como periodos y frecuencia de recirculación, y soportes a ser empleados. Con el RP se realizaron 2 fermentaciones, una vez construido el reactor propiamente dicho (RC), se efectuaron 4 fermentaciones más, usando como material de soporte acero inoxidable.

### **5.1 Sistema para formación de biopelícula**

El diseño de reactores para formar biopelícula se ha realizado en función de las necesidades específicas de cada investigación, así, se han empleado columnas circulares o cuadradas como reactores piloto para estudios de actividad global de biopelícula (Rittmman, 1986; Pedersen, et.al. 1997), se han diseñado cámaras rectangulares de flujo continuo con dimensiones desde milímetros hasta metros para generar biopelículas sumergidas (Pedersen, 1982; Lau & Liu, 1993; Sasahara & Zottola, 1993; Stoodley, et.al. 1999) y se han realizado diseños que responden a exigencias muy específicas como un reactor de placas con flujo por goteo para estudiar la heterogeneidad fisiológica (Xu, et. al. 1998), el reactor RotoTorque para crear un esfuerzo cortante sobre la película (Siebel & Characklis, 1991), un reactor con membranas como paredes para estudiar la difusión de nutrientes (Bryers & Drummond, 1998), entre otros. En el presente trabajo para formar una biopelícula tipo biofiltro percolador, se emplearon soportes sintéticos en placas colocadas horizontalmente en una rejilla dentro del reactor cúbico de volumen útil 5.4 L. Se hizo recircular el líquido compuesto por inóculo y medio mineral cada 30 min., controlando la operación de la bomba de recirculación con un temporizador para que funcionara por 40 s cada 30 min, tiempo necesario para enviar 5.4L del líquido contenido en el tanque inferior hacia la cámara superior conteniendo la rejilla y las placas de soporte. El crecimiento de la biomasa libre y fija ocurrió durante 7 y 14 días. Se utilizó una bomba de aire para suministrar oxígeno al cultivo líquido y cultivo fijo. El reactor se colocó en un cuarto de temperatura controlada a 30°C, y el pH se mantuvo alrededor de 7 con NaOH 1N.

Para evaluar la operación del reactor durante el tiempo de fermentación, se monitoreó el pH del cultivo de recirculación, se registró la temperatura en el cuarto de temperatura controlada, se midió la biomasa en el cultivo de recirculación por espectrofotometría y por proteína total, además, se midió la biomasa adherida a los soportes cuantificando por proteína total.

#### A) Mediciones de pH

La Fig. 5.1.1 muestra la evolución del pH en el cultivo de recirculación para los ensayos realizados en el reactor prototipo (RP) y el reactor propiamente dicho (RC), en ella se observa que el pH se mantuvo en un intervalo de 6.5 a 7.1. Dado que se ajustó a pH 7 cada mañana, la reducción se debe posiblemente a la formación de ácidos orgánicos producto del metabolismo microbiano. En el caso de los ensayos RP2 y RC1, la variación se encuentra fuera de dicho rango por ajustes en la operación de los reactores.

El pH del cultivo es fundamental en los procesos de adhesión de microorganismos a soportes, éste altera el estado iónico de las especies, la carga de la membrana celular y de las superficies (Irvin, 1990), por ello es necesario mantenerlo relativamente constante.

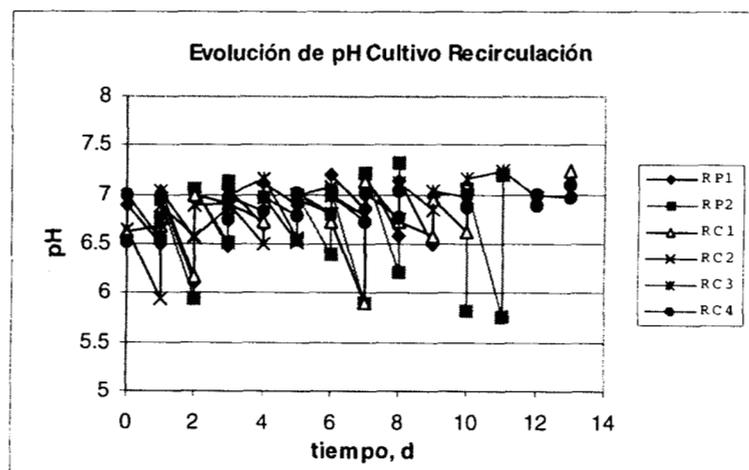


Fig. 5.1.1 Evolución del pH en el cultivo de recirculación.

#### B) Mediciones de temperatura

El registro de temperatura durante la operación de los reactores se muestran en la Fig.5.1.2. Si bien los reactores (RC) se mantuvieron en un cuarto de temperatura controlada, ocurrieron

variaciones imprevistas como en el caso del ensayo RC4, en donde cambia de 27.5 a 30°C en 6 días. Las variaciones de temperatura pueden influir en la predominancia de un grupo de microorganismos dentro de un cultivo mixto y por consecuencia en la composición de la biopelícula. El cultivo mixto empleado se ha cultivado a 30°C (Acuña, et.al. 1999), considerándolo mesófilo y ya que la variación máxima fue 3°C, no se estimó necesaria la determinación de variación en la población, pero por otra parte, la temperatura también tiene un efecto sobre las interacciones hidrofóbicas y por ende en el proceso de adhesión a los soportes (Duncan-Hewitt, 1990), además de la fisiología celular, velocidad de crecimiento y de formación de productos i.e. sustancias exopoliméricas, posiblemente todo en conjunto resultó en las variaciones de biomasa total adherida medida, según se observa en la Tabla 5.1.1.

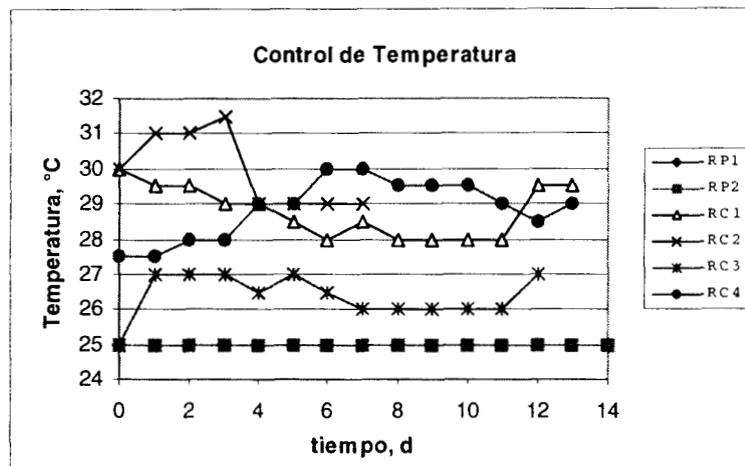


Fig. 5.1.2. Registro de temperatura en el cuarto de temperatura controlada.

### C) Mediciones de biomasa de recirculación

La evolución de la biomasa en el cultivo de recirculación medida como absorbancia de la suspensión celular a 540 nm se muestra en la Fig. 5.1.3, y medida como concentración de proteína en la Fig. 5.1.4. En estos gráficos se observan las fases típicas de crecimiento para un cultivo en lote, fase de retardo con duración de 1.5 d, fase exponencial en el periodo de 1.5 a 5 d y fase estacionaria en el periodo de 5 a 14 d. La máxima producción de biomasa en suspensión alcanzada está en el intervalo de 1000 a 1600 mg proteína/L.

No existe un acuerdo sobre las características de crecimiento entre células adheridas y células creciendo en suspensión; según diversos autores, en las biopelículas la tasa específica de crecimiento y la constante de afinidad al substrato son menores (Rittman, et. al. 1986), otros por el contrario han encontrado que son muy cercanas y que las propiedades cinéticas de biopelícula fina son iguales a las de biomasa en suspensión (Miripuri, et. al. 1997). En el presente trabajo se supuso que éstas diferían, por lo que se permitió el crecimiento de células en suspensión hasta alcanzar la fase estacionaria (6 días aproximadamente) y posteriormente se consideró un periodo de maduración de biopelícula de 6 días más.

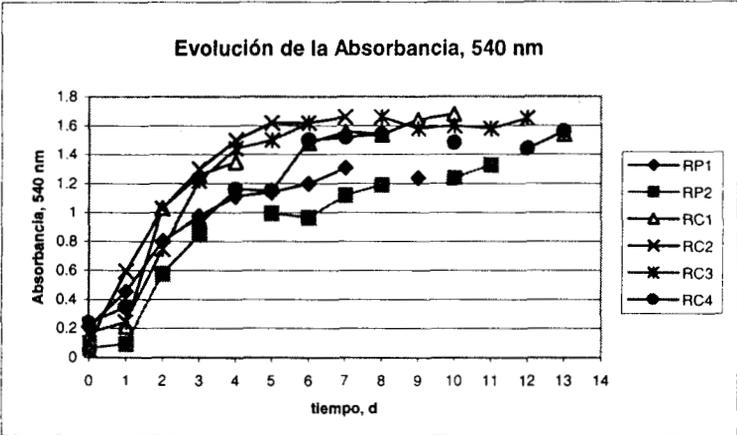


Fig. 5.1.3. Evolución de la biomasa de recirculación medida por espectrofotometría.

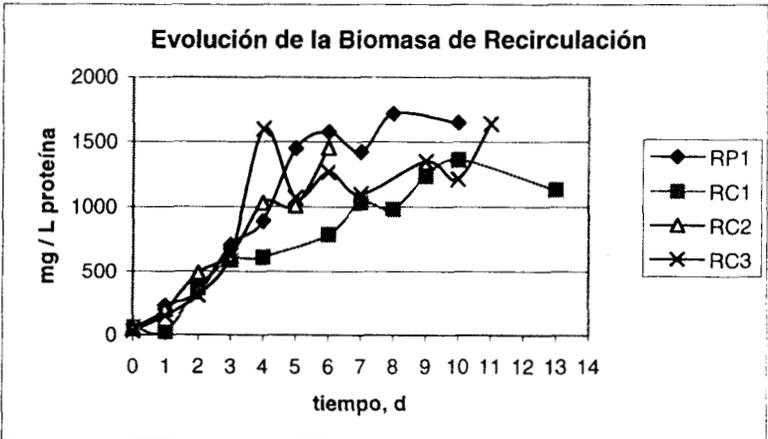


Fig. 5.1.4. Evolución de la biomasa de recirculación medida por proteína total.

#### D) Mediciones de biomasa adherida

La máxima producción de biomasa adherida sobre acero inoxidable fue aproximadamente 0.716 mg proteína/cm<sup>2</sup>, para el RC2 y 11 días de cultivo según se muestra en la Tabla 5.1.1. Este ensayo tuvo las mayores lecturas de absorbancia (Fig. 5.1.3) y de temperatura (Fig. 5.1.2), así como pequeña variación en el pH del cultivo líquido (Fig. 5.1.1) lo cual da un indicio de las mejores condiciones para formación de biopelícula para este sistema en particular.

Tabla 5.1.1. Formación de biopelícula sobre acero inoxidable, mg prot/cm<sup>2</sup>

Ensayo	Inóculo, mg prot / L	Tiempo de cultivo, d	Máximo	Mínimo	Promedio	Desviación	N
RP-1	79.48	11	0.541	0.151	0.313	0.160	5
RC-1	60.16	7	0.195	0.033	0.071	0.041	18
		14	0.639	0.148	0.361	0.134	28
RC-2	46.86	8	0.442	0.150	0.255	0.084	18
		9	0.473	0.139	0.316	0.099	8
		11	1.529	0.299	0.716	0.378	12
RC-3	30.19	12	0.850	0.506	0.699	0.116	10
RC-4	nd	14	0.402	0.180	0.298	0.073	15

nd. No determinado

Se sabe que la adhesión de bacterias a superficies sólidas en soluciones acuosas involucra la superficie de la bacteria, el soporte sólido y la fase líquida que los rodea. La superficie de la bacteria puede tener estructuras de adhesión tales como pili, fimbrias, cápsulas, o polímeros que actúen como adhesivos además, las propiedades de los componentes de la superficie celular están determinadas por la fisiología del microorganismo y varían con el crecimiento y las condiciones ambientales (Fletcher & Marshall, 1982), por todo ello, se encuentra amplia variación en la biomasa total producida en los diversos trabajos de investigación. Empleando agua de mar como inóculo y soporte placas de vidrio, en un reactor de celda de flujo continuo, se encontró una máxima producción de biopelícula (peso orgánico) de 35 µg/cm<sup>2</sup> para 21 a 25 días de cultivo (Pedersen, 1982); con *P. putida* 54G y tolueno como sustrato, en un reactor de columna empacada con anillos de cerámica, se obtuvo una producción de biomasa en 2 semanas de 0.25 a 1.5 g/m<sup>2</sup> de proteína adherida correspondientes a 25 – 150 mg proteína/cm<sup>2</sup>

(Miripuri, et. al. 1997); en biopelícula formada por un cultivo mixto incluyendo *P. putida* y como sustrato una corriente gaseosa conteniendo tolueno, se alcanzó una máxima producción de biomasa de 1460 mg/m<sup>2</sup> en 14 días, se consideró la biomasa activa como el doble de la proteína cuantificada, de este modo se estima 0.073 mg proteína/cm<sup>2</sup> (Pedersen, et.al. 1997). La concentración de biopelícula formada en el presente trabajo, 0.7 mg proteína/cm<sup>2</sup>, difiere en un orden de magnitud hacia arriba y hacia abajo con los datos antes mencionados debido probablemente a las diferencias en las condiciones experimentales.

En resumen, se diseñó y construyó un reactor para formación de biopelícula tipo biofiltro percolador, este sistema fue validado estadísticamente para la homogeneidad de formación de biopelícula en función de la posición dentro del reactor. Se monitoreó la operación del reactor siguiendo la evolución de pH, temperatura y biomasa de recirculación. En las condiciones experimentales establecidas, el pH varió en el intervalo de 6.5 a 7.1 a lo largo de 14 días de cultivo, la temperatura osciló entre 26°C y 31°C, y la biomasa de recirculación presentó una curva típica de crecimiento en lote. El tiempo de retardo fue de 1.5 días, la fase exponencial se presentó del día 1.5 al día 5, entonces comenzó la fase estacionaria prolongándose hasta el día 14. La biomasa medida en la fase estacionaria fue de 1000 a 1600 mg prot/L. Para la formación de biopelícula se asumió que la cinética de crecimiento de biomasa libre difería de la de biomasa adherida, por lo que se permitió madurar la biopelícula 6 días a partir de la fase estacionaria del cultivo de recirculación. En ese tiempo la máxima producción de biomasa adherida sobre placas de acero inoxidable fue  $0.716 \pm 0.378$  mg prot/cm<sup>2</sup>.

**225553**

## 5.2 Observaciones en microscopía

Se realizaron observaciones del aspecto microscópico de biopelícula adherida a diversos soportes inertes, polipropileno(PP), cloruro de polivinilo (PVC) y vidrio. La biopelícula fue formada empleando como fuente de carbono vapores de tolueno y glucosa. La formación de biopelícula fue más abundante con glucosa que con vapores tolueno como se observa en la Fig. 5.2.1a y 5.2.1c, tal diferencia posiblemente se debió además del tipo de fuente de carbono, a su concentración y a los sistemas de cultivo empleados, i.e. sistema de recirculación con glucosa y sistema estático en placa petri con vapores de tolueno. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son prácticamente ausentes en los cultivos con tolueno, por lo cual no se formó propiamente una biopelícula. En la Fig. 5.2.1a se observan escasos agregados celulares. En cuanto al soporte inerte empleado, no se observaron diferencias entre las biopelículas formadas sobre éstos. La presencia de EPS en células sobre PVC fue ligeramente mayor que en células sobre PP. Respecto a la formación de biopelícula, en la Fig. 5.2.1c se observan bacilos y levaduras rodeados por EPS, estos microorganismos se presentan aislados y en colonias. Se observó que las sustancias exopoliméricas se generaron únicamente en algunas células, y partían de éstas hacia aquéllas que no las producen como se muestra en la Fig. 5.2.1b.

Es clara la gran cantidad de material que rodea a las levaduras y a las colonias, en la Fig. 5.2.1c; se puede suponer que se trata de EPS que fueron coaguladas durante el tratamiento para realizar las observaciones en microscopía electrónica, como ya ha sido mencionado por otros autores, el pretratamiento de muestras para observaciones en microscopía electrónica de barrido puede alterarlas y generar artificios (Lazarova, et.al. 1995).

Las observaciones con menor aumento muestran zonas no pobladas y la formación de biopelícula como una capa inicial homogénea y posterior desarrollo de colonias verticales, según puede observarse en la Fig. 5.2.1d, confirmando las de investigaciones hechas por diversos autores sobre la colonización de soportes (Marshall, 1997; Lazarova, et. al. 1995; Wilderer & Characklis, 1989).



Fig. 5.2.1. Aspecto de biopelícula con SEM. a) Cultivo con tolueno sobre PVC. b) Cultivo con tolueno sobre vidrio. c) Cultivo con glucosa sobre polipropileno. d) Estructura y colonización de biopelícula con glucosa sobre polipropileno.

Concluyendo, las observaciones con microscopía de barrido electrónico mostraron que la biopelícula formada con vapores de tolueno fue escasa y con baja formación de sustancias exopoliméricas (EPS) en comparación a aquella formada con glucosa en un sistema de recirculación. No se encontraron diferencias en la biopelícula formada sobre vidrio, polipropileno y PVC. Sobre los soportes plásticos se observaron agregados celulares rodeados de EPS y células aisladas; aparentemente la producción de EPS se presentó únicamente ciertas células y se extendió hacia las células circundantes. La colonización del soporte inició con la formación de una capa uniforme sobre todo el soporte y posteriormente se formaron colonias verticales que fueron más heterogéneas, formando parches sobre la primera capa.

### 5.3 Actividad biológica de biopelícula con diferentes contenidos de humedad

En los procesos de biofiltración el elemento más importante en la degradación del contaminante es la biopelícula, su actividad metabólica lo transforma en productos menos tóxicos, dióxido de carbono y agua. El contaminante puede ser utilizado como fuente de carbono y energía para producción de biomasa y mantenimiento celular. En la delgada capa de biomasa que se encuentra entre el soporte y la fase gaseosa ocurren fenómenos de transporte y reacciones bioquímicas que limitan el proceso, la capa de agua en la cual está inmersa la biopelícula facilita u obstaculiza el transporte de sustratos y de metabolitos de excreción. En general, los reactores de biopelícula son caracterizados por cinéticas de consumo de sustrato, formación de biomasa o generación de producto, empleando para ello modelos que simplifican los procesos que ocurren dentro de las biopelículas aún cuando son altamente complejos. La determinación de cinéticas se ha utilizado para el estudio de poblaciones, del efecto del entorno y del proceso de formación de biopelículas. Se han investigado consorcios, cultivos mixtos, cultivos puros y la interacción de poblaciones (Siebel & Characklis, 1991; Sasahara & Zottola, 1993), así como la población o especie activa dentro de la biopelícula (Pedersen, et. al. 1997). Se ha analizado los efectos de sustratos (Rittman, et. al. 1986; Arcangeli & Arvin, 1992; Villaverde, et. al. 1997), de condiciones ambientales (Acuña, et. al. 1996; Acuña, et. al. 1999), y de biocidas y agentes sobre las cinéticas. Se han estudiado las fases de adhesión a soportes (Pedersen, et. al. 1997) y la tasa de desprendimiento (Stewart, 1993). Y se han hecho comparaciones de las cinéticas entre células en biopelícula y células libres (Miripuri, et. al. 1997).

En el presente trabajo se analizaron las cinéticas de consumo de sustrato como indicadores de la actividad biológica bajo distintos contenidos de agua en la biopelícula. Las cinéticas de consumo de tolueno se relacionaron con las cinéticas de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono.

El ensayo realizado para actividad biológica de biopelícula a 80% HR muestra que no hay actividad a lo largo de las 50 horas de duración del mismo como se muestra en la Fig. 5.3.1a. Por el contrario, en la Fig. 5.3.1b para biopelícula a 97% HR, se observa un periodo de adaptación en las primeras 12 h, en las siguientes 12 h ocurre un rápido consumo de tolueno

asociado al consumo de oxígeno y producción de  $\text{CO}_2$  y a partir de las 24 horas se estabiliza el consumo de substratos en el tiempo. Ni el tolueno ni el oxígeno fueron substratos limitantes, pues la concentración final fue aproximadamente el 50% de la inicial.

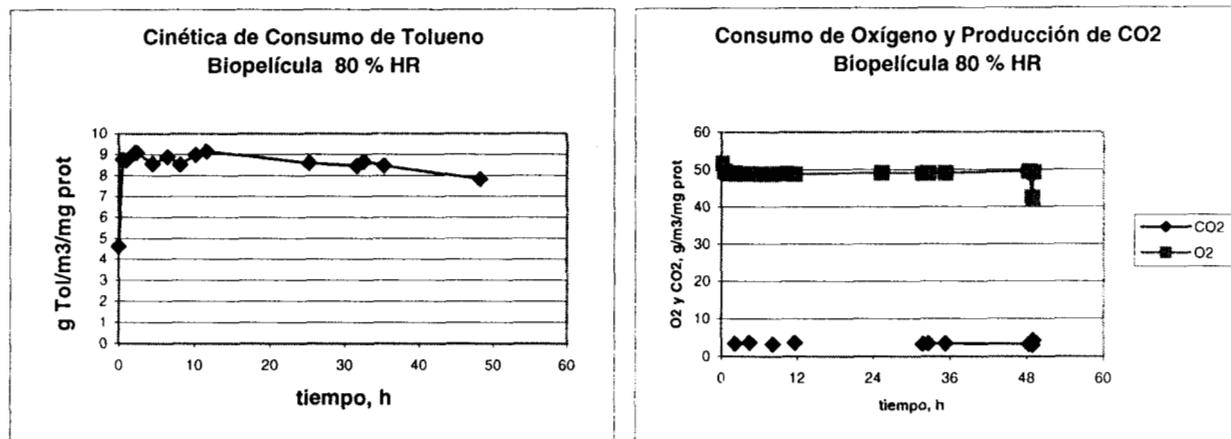


Fig. 5.3.1a. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno y producción de dióxido de carbono de biopelícula sometida a 80 % HR.

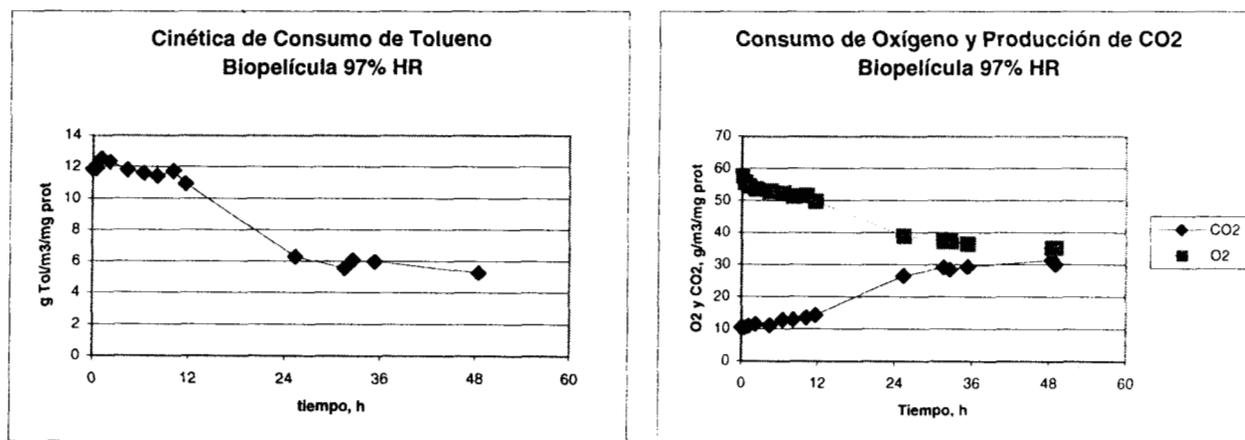


Fig. 5.3.1b. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno y producción de dióxido de carbono de biopelícula sometida a 97% HR.

Con objeto de determinar las velocidades de consumo de substrato, se midieron el tolueno, el oxígeno y el bióxido de carbono en la atmósfera de los frascos a lo largo de 20 h, desecando en este caso en particular, las biopelículas sobre acero inoxidable con atmósferas de soluciones

de concentración 0, 10, 20, 30, 40 y 50% de polietilén glicol (PEG-400) en agua. Se utilizó el modelo integrado de Gompertz para analizar las cinéticas de consumo de sustrato, según se describió en la sección 4.4.2.

En la Fig. 5.3.2 puede observarse el ajuste para una cinética de consumo de tolueno por biopelícula a 99.6% HR. Una explicación más detallada del modelo se encuentra en el Anexo 8.4.

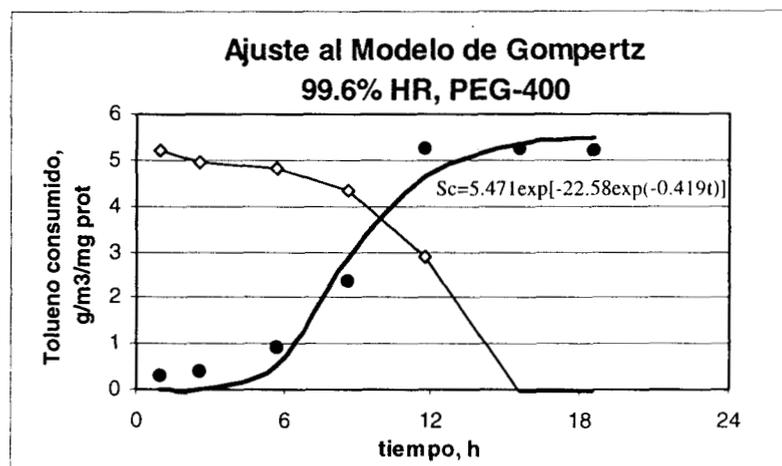


Fig. 5.3.2. Cinética de consumo de tolueno y ajuste al modelo de Gompertz.

De este modo se obtuvieron las constantes cinéticas del modelo para cada una de las condiciones de humedad relativa probadas, los resultados se muestran en la Tabla 5.3.1.

Tabla 5.3.1. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz para biopelícula sometida a desecación en atmósferas de humedad relativa controlada.

% HR	k (h <sup>-1</sup> )	V <sub>max</sub> (µg Tol/mg prot/h)
99.6	0.426 ± 0.011	121.38 ± 10.38
99.3	0.340 ± 0.0	12.29 ± 0.0
97.2	0.471 ± 0.021	45.55 ± 4.58
96.2	0.342 ± 0.049	35.29 ± 6.04
94.6	0.452 ± 0.002	51.33 ± 10.91
91.8	0.32 ± 0.141	44.028 ± 7.53

En ella se puede observar que para el intervalo de 100 a 90% HR, no hay diferencia en las constantes cinéticas medidas y no se observa una correlación entre el grado de desecación y el valor de dichas constantes (Anexo 8.5), esto se debe posiblemente al corto tiempo y el pequeño gradiente de desecación obtenido con las atmósferas de soluciones de PEG-400, además al estar dichas soluciones cerca de la saturación y no completamente saturadas, el proceso de desecación posiblemente no fue adecuado. Los valores de  $k$ , velocidad de consumo de sustrato, son cercanos a los obtenidos en un trabajo previo en donde se investigó el efecto del contenido de humedad del medio filtrante (turba) sobre la degradación de tolueno (Acuña, et. al. 1996). Los valores de  $k$  obtenidos en dicho trabajo son 0.46, 0.48 y 0.43  $\text{h}^{-1}$  para contenido inicial de agua de 70, 60 y 55% respectivamente; en este caso la retención de agua en la turba enmascaró el contenido de agua real en la fase biológica.

Debido a que no se observó una diferencia en las constantes cinéticas para un periodo de 20 h, se prolongó el mismo ensayo por 50 horas más, adicionando nuevamente tolueno y aireando los frascos. Los resultados se muestran en la Fig. 5.3.3. En ésta se observa una alta dependencia del consumo de sustrato con la humedad relativa; la velocidad de consumo de tolueno disminuye a medida que aumenta el grado de desecación.

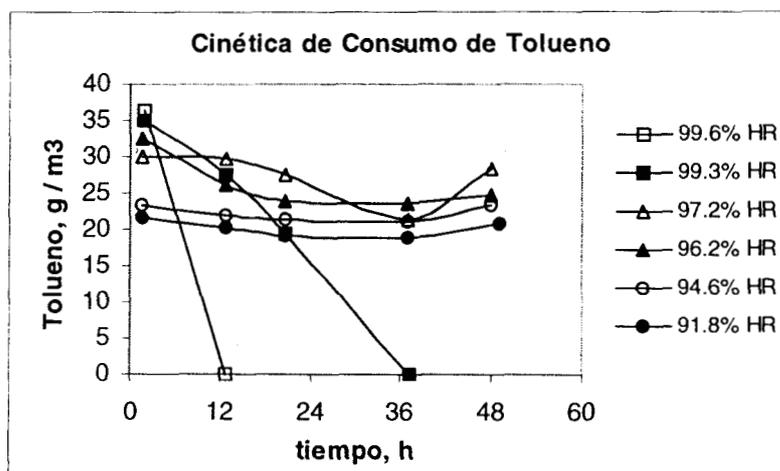


Fig. 5.3.3. Cinéticas de consumo de tolueno a diferentes humedades relativas.

Es posible diferenciar tres comportamientos, donde se consume totalmente el tolueno en 12 y 36 h para 99.6 y 99.3% HR respectivamente, donde se consume lentamente el tolueno para 97.2 y 96.2% HR, y donde no hay consumo de tolueno a lo largo de 50h para 94.6 y 91.8%

HR. En este ensayo no se realizó el ajuste a un modelo de consumo de substrato, pero aparentemente el grupo de cinéticas muestra un patrón de inhibición, sin embargo, proponer un modelo de inhibición quedaba fuera de los alcances del presente trabajo.

Durante los ensayos con gradientes de desecación mayores, i.e. 97, 84, 75, y 32% HR, se siguió el consumo de substratos por un periodo más prolongado, 120 h, realizando adiciones sucesivas de tolueno con aireación de los frascos cada vez en 0, 24 y 48 horas aproximadamente. Los resultados muestran que el tiempo de aclimatación o recuperación para iniciar el consumo de tolueno se prolongó directamente con el grado de desecación de la biopelícula (Anexo 8.8). En la Fig. 5.3.4a están representadas las cinéticas de consumo de tolueno y de oxígeno para biopelícula desecada a 97% HR, se observa que dentro de las primeras 24 horas no existe una relación entre el consumo de tolueno y oxígeno, durante este periodo es posible que el consumo de oxígeno se deba a la respiración endógena o bien, al consumo de residuos del medio de cultivo líquido de fácil asimilación. En la biopelícula desecada a 74% HR se observa un comportamiento semejante, como se muestra en la Fig. 5.3.4b., sin embargo, en este caso se requieren 60 horas para el inicio en el consumo de tolueno. Se puede suponer que este comportamiento, así como también el de la Fig. 5.3.1a, se debe al bajo contenido de agua en la biopelícula, esto reduce la biodisponibilidad de substratos disueltos (Devinny, et. al. 1999), deseca los exopolisacáridos que rodean a la células y por tanto dificulta la difusión de materiales (Cheftel & Cheftel, 1976), y tal vez, en el caso extremo, reduce el contenido de agua intracelular afectando así las reacciones enzimáticas propias para la transformación de substratos (Gómez-Puyou, 1996).

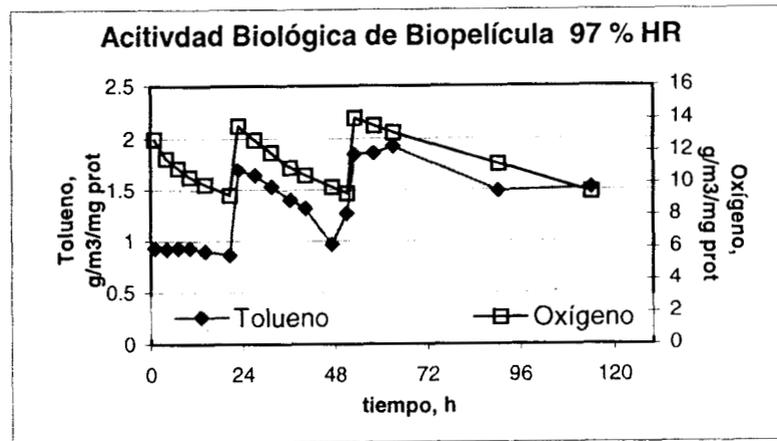


Fig. 5.3.4a. Actividad biológica de biopelícula desecada a 97% HR.

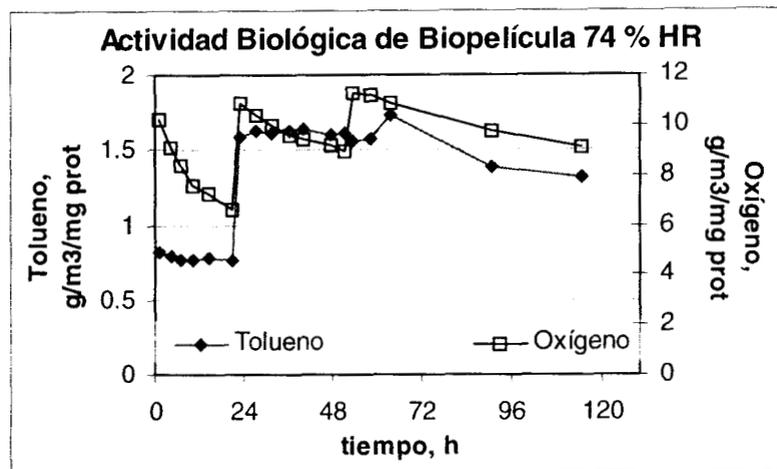


Fig. 5.3.4b. Actividad biológica de biopelícula desecada a 74% HR.

Estos resultados muestran que con altos grados de desecación existe actividad biológica pero no suficiente para consumir un sustrato complejo como es el tolueno, por el contrario, el microorganismo puede consumir oxígeno para la oxidación de algún material de reserva.

Con objeto de comparar las respuestas del grado de desecación en la actividad biológica de biopelícula, se calcularon las tasas específicas de consumo de oxígeno ( $q_s$ ) como las pendientes para cada adición sucesiva de sustrato en las curvas de consumo de oxígeno vs tiempo. En la Fig. 5.3.5 están representados los valores para las tasas específicas de consumo de oxígeno durante diferentes adiciones de sustrato en función de la humedad relativa.

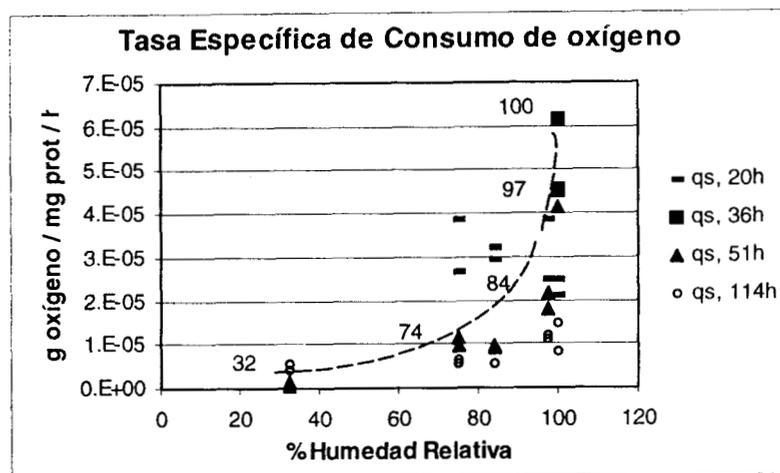


Fig. 5.3.5. Tasa específica de consumo de oxígeno de biopelícula sometida a tratamiento de desecación.

Para el primer periodo, 20 h, no existe una tendencia clara entre la tasa específica de consumo de oxígeno y la humedad relativa, esto indica un periodo de aclimatación, o bien, que no se había alcanzado el equilibrio de humedad entre la atmósfera y la biopelícula. La siguiente medición, 36 h, se realizó únicamente en la biopelícula sometida a 100 y 97 % HR ya que su actividad fue suficientemente elevada para consumir totalmente el tolueno en ese corto tiempo. Las mediciones realizadas a las 51 horas muestran claramente una relación entre la tasa específica de consumo de oxígeno y el grado de desecación. A medida que aumenta el grado de desecación, menor humedad relativa en la atmósfera, disminuye la qs, también se observa que el intervalo en el cual cambia drásticamente la tasa específica de consumo se encuentra entre 84 y 97 % HR. La última medición efectuada a las 114 h, muestra una tendencia semejante a la anterior pero más suave.

Algunos autores han reportado que la respiración endógena contribuye significativamente en los requerimientos de oxígeno (Villaverde, et. al. 1997) y han encontrado que el daño que causa la exposición prolongada a solventes en las células produce un crecimiento críptico (crecimiento a expensas de productos de la lisis celular) y metabolismo endógeno. Entonces podría suponerse que la velocidad específica de consumo de oxígeno es afectada no solo por la humedad relativa, sino también por lisis celular debido a la prolongada exposición a vapores de tolueno, además de la posible carencia de otros nutrientes al final del periodo. La

variabilidad de los resultados depende del tiempo en que la película ha estado bajo estrés por secado, así, en un sistema de biofiltración de aire mientras más tiempo permanezcan las condiciones de sequedad en el lecho, menor será la eficiencia de remoción de contaminantes.

En resumen, la actividad biológica fue determinada por cinéticas y velocidades de consumo de sustratos para biopelícula desecada por equilibrio con atmósferas de 100% HR a 32% HR.

En resumen, los resultados mostraron que la actividad biológica disminuyó con el grado de desecación hasta actividad nula, este comportamiento se debió posiblemente a la disminución en la biodisponibilidad de sustratos, a la interferencia en la difusión de compuestos y a la alteración de la actividad enzimática intracelular. En las cinéticas de consumo de tolueno se observó un periodo de aclimatación o recuperación que fue proporcional al grado de desecación, dicho periodo no se presentó en las cinéticas de consumo de oxígeno, se asumió entonces que el consumo inicial de  $O_2$  fue debido al metabolismo endógeno. Las biopelículas con desecación de 100% HR a 90% HR y 20 h de exposición a vapores de tolueno no presentaron diferencias en las constantes cinéticas del modelo de Gompertz para consumo de tolueno, este ensayo se prolongó hasta 50 h obteniéndose una familia de cinéticas que aparentemente siguieron un patrón de inhibición. Se realizaron entonces cinéticas de consumo de sustratos por 120 horas con aireaciones y adiciones de tolueno sucesivas para 0, 24 y 48h. Se estimaron las tasas específicas de consumo de oxígeno para cada nueva adición de sustrato, los resultados obtenidos indican que la tasa de consumo de oxígeno disminuye con el nivel de desecación encontrándose un cambio crítico entre 97% HR y 84% HR.

## 5.4 Actividad biológica de biopelícula rehumectada

El fenómeno de secado de material filtrante ocurre frecuentemente en los procesos de biofiltración, éste puede producirse por el calor metabólico generado durante la transformación de los contaminantes, por un bajo contenido de humedad en el aire influente, por una inadecuada programación en los periodos de rocío del soporte y por intercambios de calor y masa con el medio ambiente en sistemas abiertos (Van Lith, et. al. 1997). De ese modo se hace necesaria la eventual rehumectación del medio filtrante. Los estudios sobre este tópico son escasos, se ha investigado el efecto del contenido inicial de agua en la degradación de etanol después de un periodo de secado y rehumectación por cambios en la humedad relativa del gas influente (Auria, et. al. 1998).

En el presente trabajo se desecaron biopelículas por equilibrio con atmósferas de diversas humedades relativas durante 68 h; posteriormente se rehumectaron por contacto con una atmósfera a 100% HR, por aspersion con agua destilada hasta humedecer visiblemente toda la biopelícula y por inmersión durante 1 h en agua destilada. Enseguida se midió la actividad biológica mediante cinéticas de consumo de tolueno. Las cinéticas de consumo de tolueno y oxígeno para biopelícula desecada de 32 a 100% HR y rehumectada con una atmósfera de 100% HR durante todo el periodo de medición se muestran en la Fig. 5.4.1.

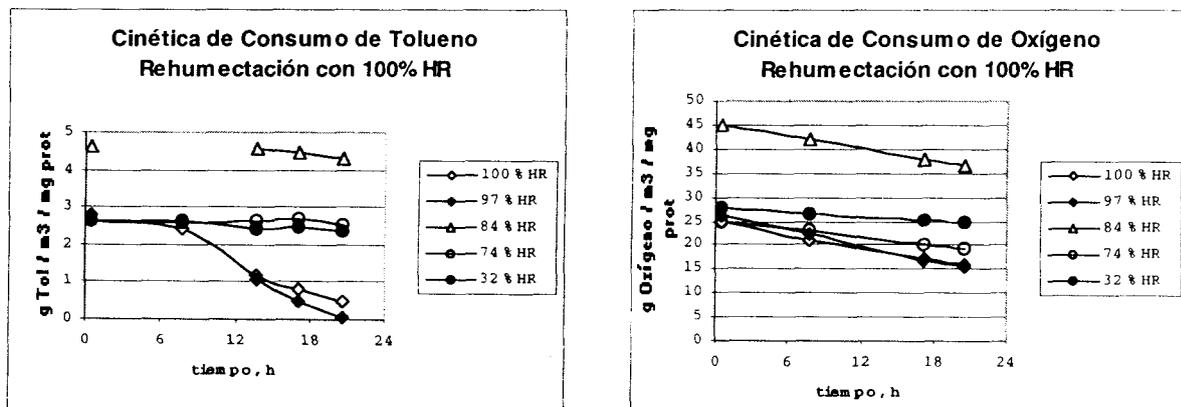


Fig.5.4.1. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno para biopelícula rehumectada con atmósfera de 100% HR.

En ellas se observa que la actividad biológica es semejante en las biopelículas que fueron desecadas a 100 y 97% HR, en estas condiciones se observa un retardo de 7 h en el inicio del consumo de tolueno pero es consumido completamente en 21 horas. En otros trabajos se ha reportado que después de restablecer la humedad relativa inicial, se requirieron 2 horas para alcanzar el estado estacionario en un biofiltro de turba (Auria, et. al. 1998). Las líneas de consumo de oxígeno presentan la mayor pendiente, existe una reducción de 9 g oxígeno/m<sup>3</sup>/mg proteína en 20 horas. Por otra parte, la actividad biológica para las biopelículas desecadas a 84, 74 y 34% HR es nula considerando el consumo de tolueno, entonces el consumo de oxígeno observado es atribuible a la respiración endógena. La desecación a 84% HR impide el consumo de tolueno, sin embargo, permite el consumo de residuos celulares. En los casos extremos de desecación, 74 y 32% HR, incluso el metabolismo endógeno es reducido.

Las cinéticas de consumo de tolueno y oxígeno para biopelícula rehumectada por aspersión se muestran en la Fig. 5.4.2. Como en el caso de rehumectación con atmósfera a 100% HR, la mayor actividad biológica se encuentra en las biopelículas desecadas a 100 y 97% HR, el tolueno se consume totalmente en un periodo menor, 9 horas y no se observa el periodo de retardo o aclimatación. Las pendientes del consumo de oxígeno están determinadas por una reducción entre 8 y 11 g oxígeno/m<sup>3</sup>/mg proteína en 9 horas.

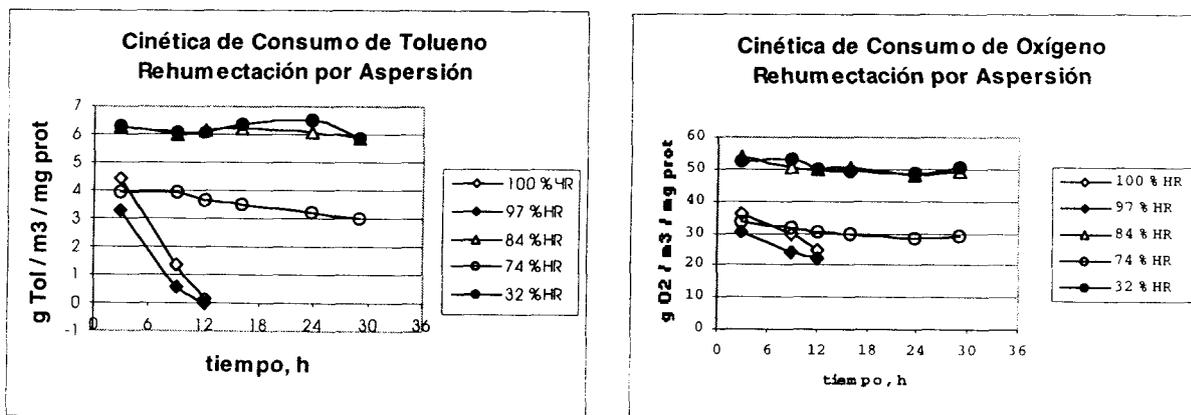


Figura 5.4.2. Cinéticas de consumo de tolueno, oxígeno para biopelícula rehumectada por aspersión.

Las biopelículas desecadas con humedades relativas 84 y 32% HR no tuvieron actividad biológica ya que las concentraciones de tolueno y oxígeno permanecieron casi constantes durante 30 horas. En contraste, la biopelícula desecada a 74% HR muestra actividad biológica, debido probablemente a un proceso deficiente de desecación.

La actividad biológica de la biopelícula rehumectada por inmersión disminuye directamente con el grado de desecación según se observa en la Fig. 5.4.3. El consumo total de tolueno ocurrió en 13, 25 y 30 horas para desecación de 100, 97 a 74 y 32% HR respectivamente. A su vez, el periodo de retardo o aclimatación aumentó progresivamente con la desecación, para secado con 32% HR y 97 % HR transcurrieron 16h y 8h respectivamente. Las pendientes correspondientes a las cinéticas de consumo de oxígeno no muestran una correlación con el grado de desecación, éstas se encuentran en el intervalo de 0.6 a 0.35.

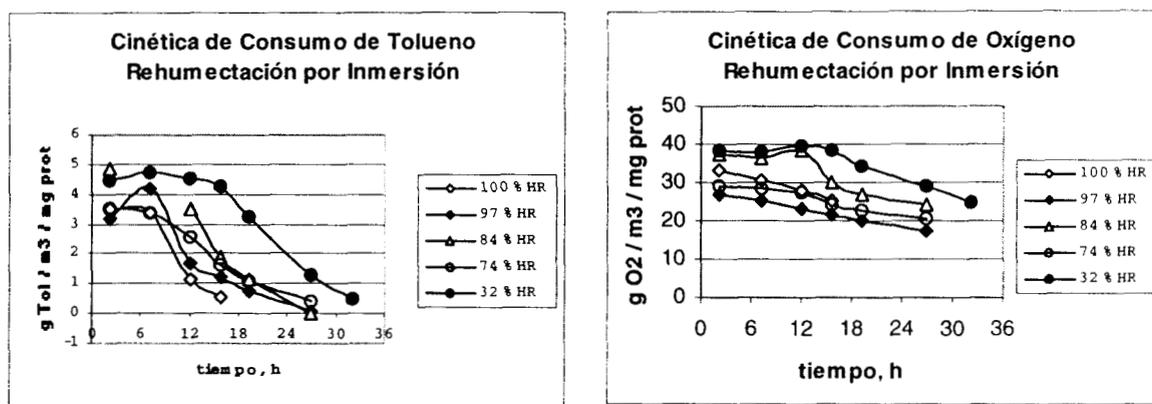


Figura 5.4.3. Cinética de consumo de tolueno, oxígeno para biopelícula rehumectada por inmersión.

Los tres métodos de rehumectación resultaron efectivos para biopelícula con bajo grado de desecación, 100 y 97% HR. La velocidad en el consumo de tolueno aumentó con la cantidad de agua empleada para la rehumectación, fue mayor en la biopelícula rehumectada por aspersion que en la rehumectada con atmósfera de 100% HR. En este último caso posiblemente la sorción de moléculas de agua no fue suficiente para humectar las células en la base de la biopelícula o bien, se requería un mayor periodo de exposición. Se ha observado que durante los procesos de secado aumenta la hidrofobicidad de los materiales (Cárdenas-González, et. al. 1998), entonces es posible que al ser desecado el glicocalix de las células

cambiara la conformación de los carbohidratos y proteínas que lo componen volviéndolos más hidrófobos, de manera que las moléculas de agua en lugar de rehumectar esos polímeros, formaron una estructura alrededor de éstos (Gabler, 1978).

Aparentemente, la rehumectación por aspersion produjo una mayor velocidad en el consumo de tolueno que la rehumectación por inmersión, probablemente la película de agua sobre las células fue suficiente para permitir la recuperación del metabolismo microbiano pero no para obstaculizar el transporte del substrato hidrofóbico a la célula. Se ha reportado que un bajo contenido de agua en los soportes filtrantes favorece la degradación de compuestos hidrofóbicos (Ostlie-Dunn, et al. 1998). Para confirmar esta hipótesis hubiera sido necesario medir el contenido de agua en cada biopelícula con cada método de rehumectación, sin embargo, esto no se realizó. Es posible también que durante el periodo de inmersión (1h), ocurriera un lavado de células, componentes de la biopelícula o de nutrientes.

Al parecer el método de rehumectación por inmersión fue el más efectivo, pues en todos los casos de desecación se recuperó la actividad. Este comportamiento corresponde a la constitución de la biopelícula, ente el 50 y 80% son sustancias exopoliméricas que forman una matriz altamente hidratada (hidrogel) con un contenido de agua superior al 98%, por otra parte las células bacterianas pueden contener hasta 93% de agua, además, las proteínas que pueden ser el 50% del total de la biomasa están rodeadas por tanta agua que normalmente se encuentra 1 g de agua por gramo de proteína (Gabler, 1978; Bakken, et. al. 1983; Lazarova & Manem, 1995; Zhang, et. al. 1998; Schmitt & Flemming, 1999), por todo ello, el mejor método de rehumectación fue aquél en donde se utilizó mayor cantidad de agua, pero debe considerarse también el tiempo de contacto con el agua, ya sea en vapor, rocío o grandes volúmenes en relación a la biopelícula.

En términos prácticos, la rehumectación del soporte en un biofiltro requeriría un balance para evitar la inundación del lecho, la creación de zonas anaerobias y la lixiviación de nutrientes, además del consumo de agua y tiempo en el proceso (Devinny, 1999).

A manera de resumen, después de la desecación de biopelícula durante 68 h a diferentes niveles de humedad relativa, se rehumectaron por exposición a una atmósfera con 100% HR, por aspersion de agua destilada y por inmersión en agua destilada. Los tres métodos de rehumectación fueron eficaces para biopelícula con bajo grado de desecación, 97% HR y

100% HR. Se observó que la recuperación de la actividad biológica tuvo correlación con la cantidad de agua empleada. La velocidad de consumo de tolueno fue mayor en biopelícula rehumectada por aspersión que por atmósfera de 100% HR, sin embargo, también fue ligeramente mayor que por inmersión, posiblemente el bajo contenido de humedad favoreció la degradación del tolueno, compuesto hidrófobo. Se consideró como mejor método de rehumectación la inmersión, ya que en todos los niveles de desecación la biopelícula recuperó su actividad, esto se atribuyó a la constitución de la biopelícula, que en gran proporción es agua. Los resultados obtenidos señalan la importancia de evitar el secado del lecho filtrante en los sistemas de tratamiento de aire por la pérdida de actividad biológica, así como también la posibilidad de regenerar dichos filtros a diferencia de considerar la pérdida de actividad como irreversible, sin olvidar el método, la cantidad de agua y el tiempo de contacto en la rehumectación.

## 5.5 Adsorción de tolueno sobre soportes y material biológico

Con frecuencia los estudios sobre la adsorción de compuestos orgánicos volátiles sobre materiales orgánicos, aplican los modelos de adsorción más comunes (BET, Langmuir, Freundlich, etc.), considerando únicamente la región donde el modelo provee una adecuada descripción de los datos, esto ocurre habitualmente a bajas concentraciones del compuesto volátil (Karanfil & Kilduff, 1999). Se han realizado estudios para determinar el papel del ácido húmico en la adsorción de tolueno en un material de acuífero, en donde se utiliza el modelo de lineal para establecer la isoterma de adsorción (Tell & Uchrin, 1991). Otros autores han analizado el efecto del contenido materia orgánica sobre la adsorción, aunque se ha encontrado una adsorción no lineal, han hecho simplificaciones considerándola lineal (Ruiz, et. al. 1999).

En el presente trabajo se determinaron isotermas de adsorción sobre soportes inertes con objeto de cuantificar el error por sorción sobre el soporte durante las mediciones de consumo de tolueno durante los ensayos de respirometría, y para contribuir al conocimiento de la sorción de volátiles sobre biomasa.

En la Fig. 5.5.1a se muestra que el acero inoxidable no adsorbe las moléculas en fase gas de tolueno, debido a la baja porosidad de este material.

La isoterma de adsorción sobre polipropileno representada en la Fig. 5.5.1b muestra un comportamiento lineal, lo que hace suponer que las moléculas de tolueno no solo se adsorben sobre este material sino que se absorben en él lentamente, al menos en el rango medido, de tal manera que conforme transcurre el tiempo la medición de tolueno aparentemente adsorbido aumenta. Por este comportamiento se eliminó el polipropileno como soporte modelo para la los ensayos de respirometría.

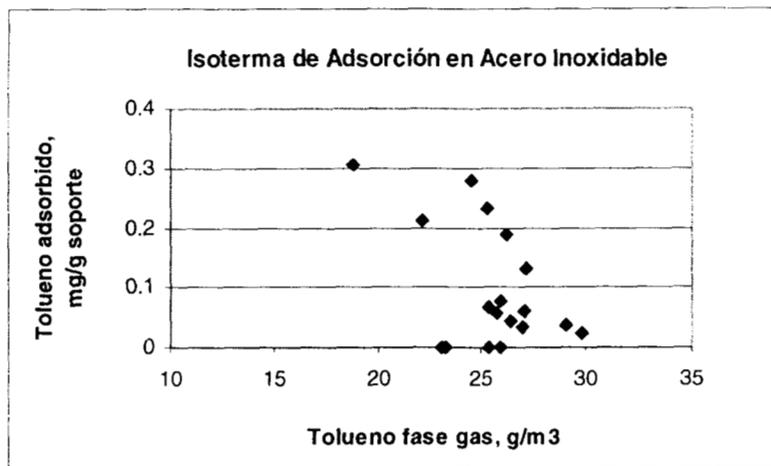


Fig. 5.5.1a. Isoterma de adsorción de tolueno sobre acero inoxidable

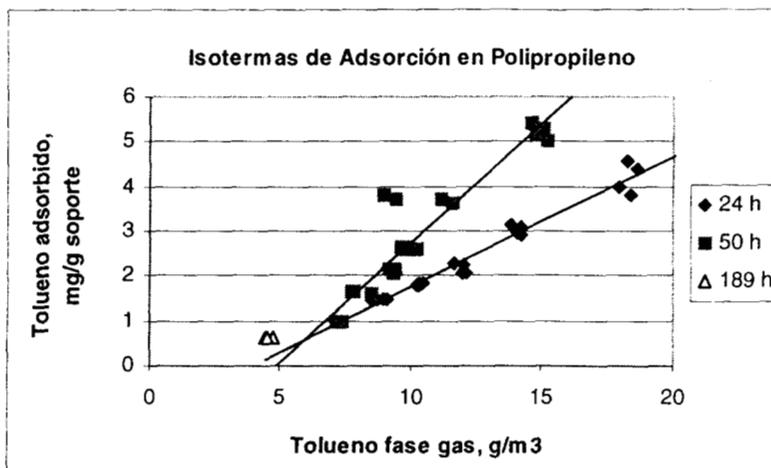


Fig. 5.5.1b. Isoterma de adsorción de tolueno sobre polipropileno.

En la Fig. 5.5.2 se observan isotermas de adsorción de adsorción de tolueno sobre biomasa seca realizadas a diferentes tiempos 87, 48 y 109 h con objeto de verificar el equilibrio. La forma de esta isoterma, del tipo III (Lowell & Shields, 1991), indica que la primera capa adsorbida facilita la adsorción de las siguientes capas de sorbato, en este caso el tolueno. Para el intervalo de 10 a 20 g/m<sup>3</sup> de tolueno en la fase gas, la cantidad adsorbida permanece entre 1 y 3 mg/g soporte, en el intervalo 20 a 25 g/m<sup>3</sup> tolueno fase gas, el tolueno adsorbido aumenta de manera importante hasta 15 mg/g biomasa seca.

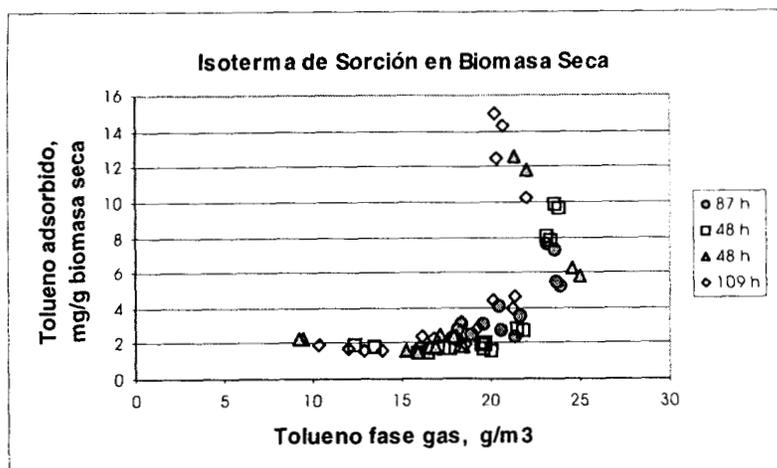


Fig. 5.5.2. Isoterma de sorción de tolueno sobre biomasa seca.

La concentración inicial de tolueno en fase gas durante los ensayos de respirometría fue de 21 a 24 g tolueno/m<sup>3</sup> (3 a 3.5 mg tolueno por frasco), considerando la isoterma de adsorción en ese intervalo, se estima un error por adsorción en la biomasa entre 2 y 15 mg tolueno adsorbido/g biomasa seca. Con base en lo anterior, y asumiendo que se tenía 30.72E-3 ± 11.34E-3 g de biomasa seca por frasco en los ensayos de respirometría, se estimó que entre 0.061±0.022 y 0.461±0.170 mg de tolueno podría ser adsorbido, por tanto, el error por adsorción del compuesto volátil durante los ensayos de consumo de substrato se consideró despreciable. Considerando los biofiltros para remoción de tolueno, la isoterma de adsorción sobre biomasa permite confirmar que la disminución de este compuesto no se debe a la adsorción sobre la fase biológica, ya que las concentraciones más altas aplicadas son < 5 g Tol/m<sup>3</sup>, en cuyo caso la adsorción sería de 2 mg/g biomasa seca.

Concluyendo, al determinar las isotermas de adsorción sobre acero inoxidable, polipropileno y biopelícula seca se encontró que el primero no adsorbió el tolueno, en el polipropileno se absorbió, por lo cual se eligió acero inoxidable como soporte para la formación de biopelícula. La isoterma de adsorción de biopelícula fue del Tipo III, indicando que la primera capa adsorbida facilitó la adsorción de las siguientes capas de tolueno. Utilizando esta isoterma de adsorción, se estimó que la adsorción de tolueno durante los ensayos de respirometría fue despreciable, encontrándose en el intervalo de 0.061 mg tolueno a 0.461 mg de tolueno adsorbido en la cantidad de biomasa utilizada.

## 5.6 Isoterma de desorción de agua

Durante la operación de biofiltros, el fenómeno de secado puede ocurrir por una inadecuada humidificación del lecho filtrante, por la elevación de la velocidad de flujo de aire y de su temperatura, por el calor metabólico generado por los microorganismos durante las reacciones de oxidación y por intercambios con el medio ambiente (Van Lith, et. al. 1997).

Los métodos para medir el contenido de humedad en materiales son el gravimétrico, análisis de agua con la técnica de Karl-Fischer y el punto de rocío. En las investigaciones realizadas sobre contenido de humedad en medios filtrantes y su relación con el desarrollo de biofiltros, generalmente se ha empleado el método gravimétrico (Auria, et. al. 1998; Morales, et. al. 1998; Cox, et. al. 1996), aunque la determinación del punto de rocío por mediciones de  $A_w$  es preferible pues es una medida de la disponibilidad del agua (Bohn & Bohn, 1999); actualmente se utilizan mediciones de potencial de agua y espectroscopía FTIR para estudios moleculares de agua enlazada en biopelículas (Schmitt & Flemming, 1999).

Con el propósito de verificar el grado de desecación alcanzado por la biopelícula, se determinaron curvas de secado estático a temperatura ambiente. Se determinaron isotermas de desorción de agua, apoyándose en mediciones gravimétricas del contenido de agua y mediciones de actividad de agua.

La Fig. 5.6.1 muestra una cinética de secado de biopelícula, la desorción de agua se midió como la variación de la actividad de agua de la biopelícula en el tiempo.

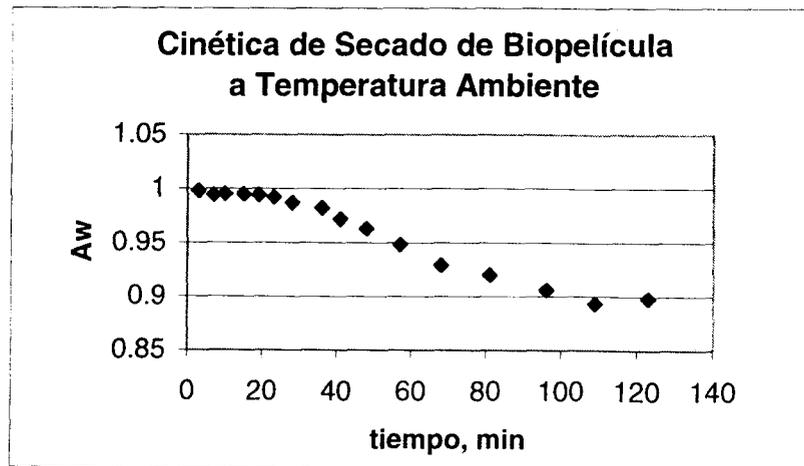


Fig. 5.6.1. Cinética de secado de biopelícula a temperatura ambiente.

Se puede observar una disminución en la  $A_w$  desde 1 hasta 0.9 en un periodo de 2 horas, dentro de los primeros 30 min. la variación es pequeña y corresponde al segmento AB en una curva típica de secado según la Fig. 1.5.2.1. En el intervalo de 30 a 90 min. la variación en la  $A_w$  es mayor, correspondiendo al periodo BC en la misma curva. El periodo de 100 a 120 min corresponde a una tasa de secado igual a cero.

En los materiales con estructura fibrosa, gelatinosa o amorfas, como es el caso de las biopelículas, la humedad es una parte integral de la estructura molecular y también se encuentra físicamente atrapada en capilares y poros interiores. En materiales amorfos el movimiento de humedad es lento, el líquido difunde a través de obstáculos estructurales de la configuración molecular. Las curvas de secado tienen un corto periodo de velocidad constante, terminando en un contenido de humedad crítico muy alto porque el agua permanece íntimamente asociada en los espacios intersticiales de las moléculas del material (Lachman, et.al. 1986).

Las cinéticas de secado de biopelícula a temperatura ambiente representadas en la Fig. 5.6.2, muestran la variación del peso de biopelícula por unidad de área en el tiempo para los tres materiales ensayados, PVC, Polipropileno y Acero Inoxidable. Se encontró que la mayor formación de biopelícula se obtuvo empleando como soporte acero inoxidable con peso seco de  $0.343 \text{ mg biomasa/cm}^2$ . Además, se puso en evidencia la sensibilidad del método gravimétrico contra las mediciones de  $A_w$ , con el primero no se distinguen las fases de la curva de secado posiblemente por la heterogeneidad de la biopelícula, en donde se encuentra agua libre, agua asociada al glicocalix y agua asociada a las células de manera que se enmascaran los fenómenos que están ocurriendo.

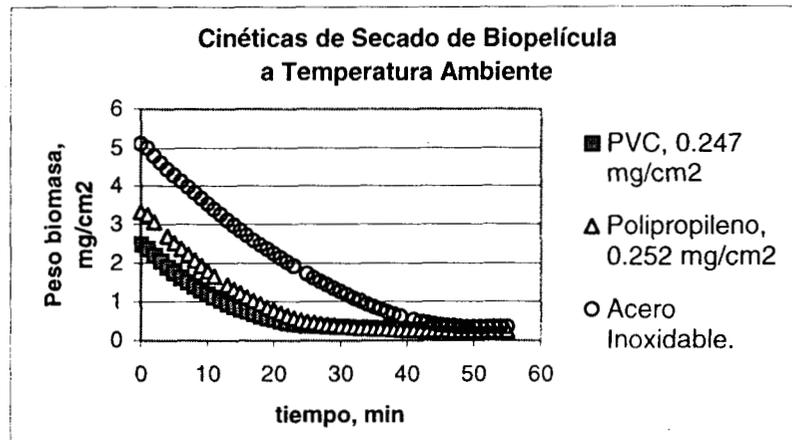


Fig. 5.6.2. Cinéticas de secado de biopelícula sobre distintos materiales.

En la Fig. 5.6.3 se observan las curvas de velocidad de secado para cada material. La velocidad de secado fue calculada como la variación en el peso húmedo de la biopelícula entre el intervalo de tiempo respectivo y graficada contra la media aritmética de dicho intervalo (Lachman, et. al. 1986). En ellas es posible observar tres secciones en donde la pendiente va disminuyendo, lo cual corresponde a una velocidad de secado constante, una disminución constante de la velocidad de secado, y una velocidad de secado cero, comportamientos típicos de una curva de secado.

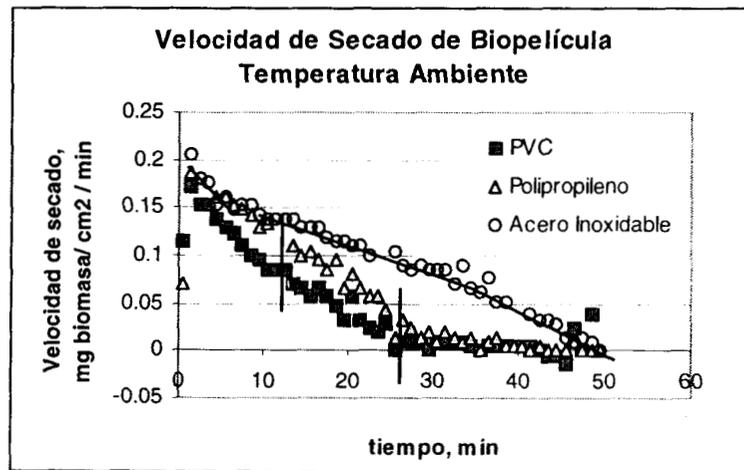


Fig. 5.6.3 Velocidad de secado de biopelícula sobre soportes a temperatura ambiente.

Las Fig. 5.6.4 y Fig. 5.6.5 muestran la variación en el contenido de humedad de biopelícula en función de la humedad relativa y la actividad de agua respectivamente. Dado que  $A_w = \%HR / 100$  en el equilibrio, se convirtieron los datos de la Fig. 5.6.6 en la isoterma de desorción de agua en biopelícula a 30°C, Fig. 5.6.5.

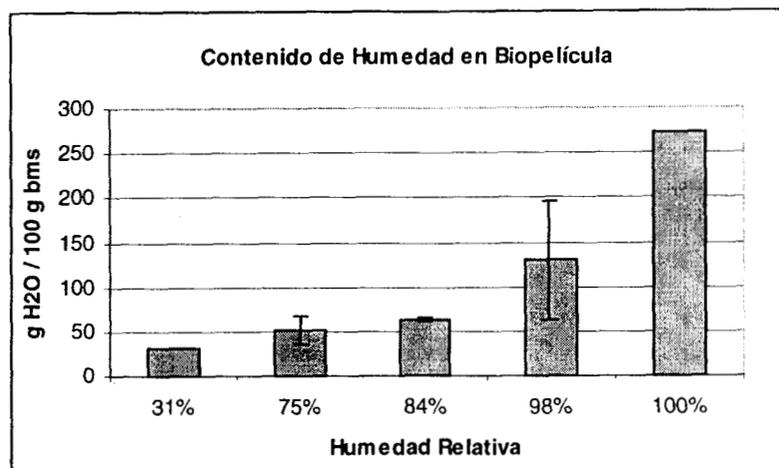


Fig. 5.6.4. Contenido de humedad en biopelícula desecada a %HR controlada.

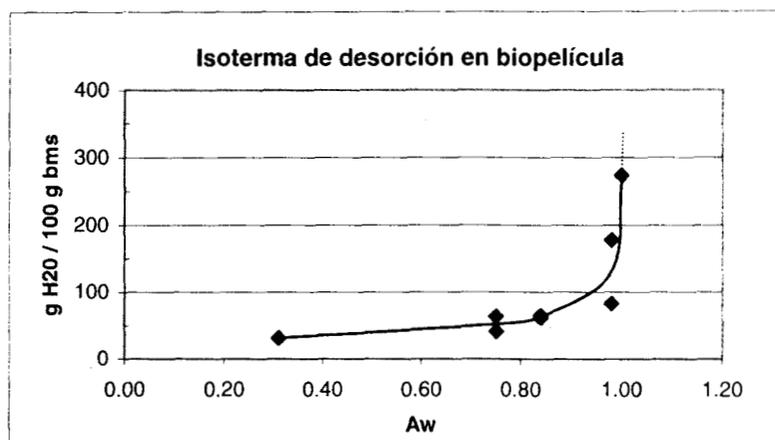


Fig. 5.6.5. Isoterma de desorción de agua en biopelícula.

En algunos materiales orgánicos el equilibrio entre  $A_w$  y %HR jamás se realiza debido a su estructura y las asociaciones entre las moléculas de agua y de proteínas y carbohidratos (Cheftel & Cheftel, 1976). La isoterma de desorción para *E. jeanselmei* creciendo sobre perlita tiene una forma semejante, con 5 y 32% de contenido de agua para 0.75 y 1.0 de  $A_w$

respectivamente (Cox, et. al. 1996). Con base en el gráfico de dispersión de la Fig. 5.6.5, se propuso el siguiente modelo de regresión no lineal para la isoterma de desorción  $Y = \frac{aX}{1-X}$  donde Y es el contenido de humedad (g H<sub>2</sub>O/100g biomasa seca) y X es la actividad de agua. El modelo estimado tuvo un error de 316.95, éste se presenta en la Fig. 5.6.6.

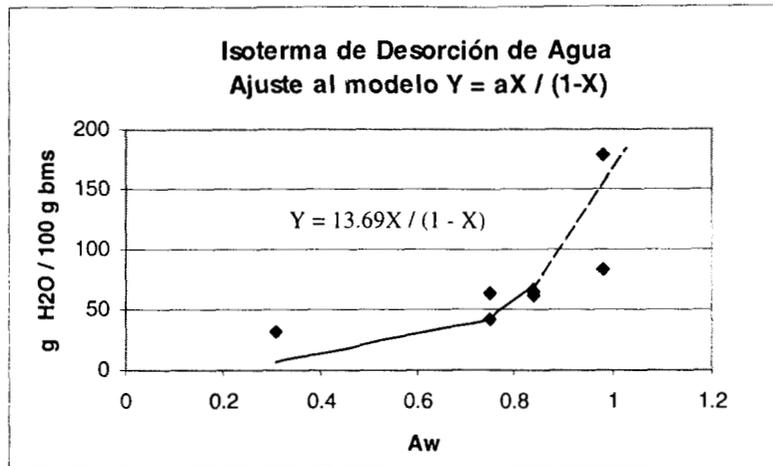


Fig. 5.6.6. Isoterma de desorción de agua. Ajuste al modelo  $Y = aX / (1-X)$

También se ajustaron los datos experimentales al modelo de BET,  $\frac{a}{M(1-a)} = \frac{1}{M_1C} + \frac{a(C-1)}{M_1C}$

Donde a es Aw, M es el contenido de agua, M<sub>1</sub> es el contenido de agua de la capa monomolecular y C es una constante. Se obtuvo la ecuación de ajuste con error de 8.19E-5, ésta se muestra en la Fig. 5.6.7

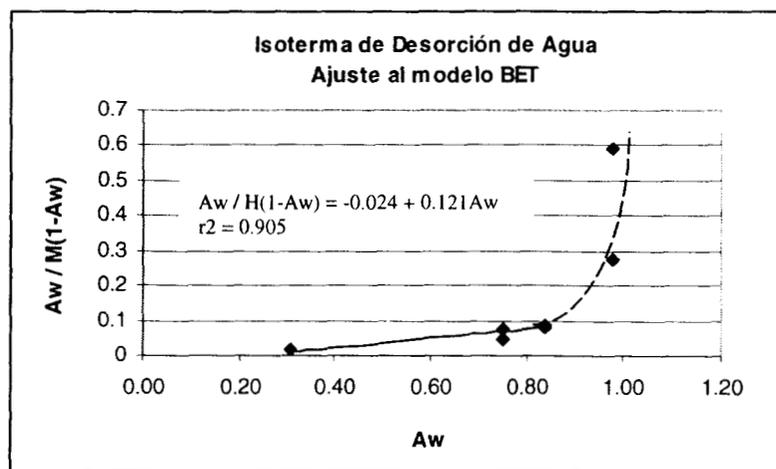


Fig. 5.6.7. Isoterma de desorción de agua. Ajuste al modelo de BET.

Existen estudios en donde se describen modelos para isothermas de sorción de agua (Peleg, ?) tal como  $m = K_1 * Aw^{n_1} + K_2 * Aw^{n_2}$ , donde m es el contenido de humedad, Aw es la actividad de agua,  $K_i$  y  $n_i$  son constantes ( $n_1 < 1$  ;  $n_2 > 1$ ); ese modelo tiene el mismo ajuste que el modelo GAB. Pero los modelos BET y GAB describen isothermas sigmoidales y se fundamentan en la suposición de que existe una monocapa de agua bien definida. El desarrollo de modelos de sorción supone superficies sólidas, se hacen con gases distintos al vapor de agua y se aplican solo a la primera capa monomolecular adsorbida, por ello solo concuerdan con los resultados experimentales con valores bajos de Aw, concretamente inferiores a 0.4 y 0.5 (Cheftel & Cheftel, 1976). En este trabajo los datos experimentales parecen ajustar adecuadamente al modelo propuesto y al modelo de BET hasta  $Aw = 0.84$ , pero hay que notar que en el intervalo importante para actividad biológica, i.e. Aw cercana a 1, la dispersión de los datos no permiten un buen ajuste del modelo, por lo cual su utilidad se limita a la estimación del mínimo contenido de agua necesario para asegurar actividad biológica de la biopelícula, en este caso particular 300 g H<sub>2</sub>O/100 g biomasa seca o 75% contenido de agua en base húmeda. En la Fig. 5.6.8 se muestra la cinética de secado de biopelícula sometida a 100 % HR, esta cinética fue determinada gravimétricamente y por mediciones de Aw simultáneamente, a temperatura ambiente. En ella se observan las fases de una curva estándar de secado; en la primera fase indicada por el periodo de 0 a 30 min., el agua libre indicada por Aw, varía de 0.99 a 0.84 y el peso de la biomasa húmeda de 22.4 a 9.4 mg, en esta fase se estabiliza la temperatura y es constante mientras permanece la película de agua en la superficie, también la velocidad de secado es constante. Valores elevados de Aw corresponden a agua libre por lo que la variación en peso es grande, el agua se evapora fácilmente.

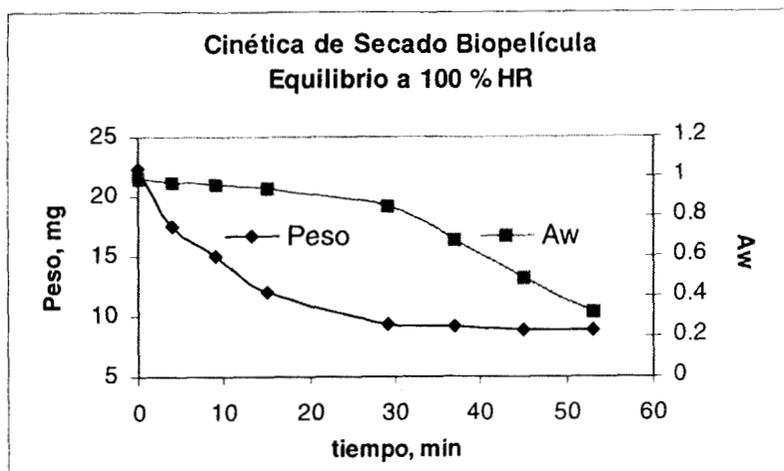


Fig. 5.6.8. Cinética de secado de biopelícula sometida a 100% HR.

En la segunda fase, del minuto 30 al 55, la película superficial de agua está completamente evaporada, entonces el secado depende de la difusión de la humedad a la superficie de la biopelícula y la velocidad de secado se reduce a prácticamente cero, el agua libre disminuye rápidamente de 0.84 a 0.32. Nuevamente se observa que en  $A_w = 0.84$  ocurre un cambio crítico en la forma de enlace del agua a la biopelícula.

Ya que las biopelículas están compuestas en 90% de agua, éstas son consideradas hidrogeles (Schmitt & Flemming, 1999), por lo que el enlace y movilidad de agua determinan los procesos de difusión y en este caso de desecación. Los autores mencionados han estudiado dicho enlace empleando espectroscopía FTIR, caracterizaron el proceso de intercambio de agua en dos etapas: la primera completada en 49s y la segunda después de 21 min, lo cual indicó diferentes mecanismos de retención de agua en biopelícula de población mixta. Este proceso fue totalmente completado después de 2 h. En la Fig. 5.6.8 se observan 2 etapas diferenciadas a los 30 min. aproximadamente, este valor se encuentra en el mismo orden, la variación posiblemente se debe al crecimiento y origen de la biopelícula. En este experimento no fue técnicamente posible seguir el proceso completo de desecación, por limitaciones en la sensibilidad del método gravimétrico y en el funcionamiento del equipo para determinar  $A_w$ .

En la Fig. 5.6.9 se observa un comportamiento semejante al descrito anteriormente, en este caso la biopelícula fue sometida a 97 % HR, aquí la variación es más lenta debido a que el

contenido inicial de agua es menor, la Aw se reduce de 0.7 a 0.3 en 14 min. y el peso húmedo de biopelícula disminuye de 11.7 a 9.3 mg.

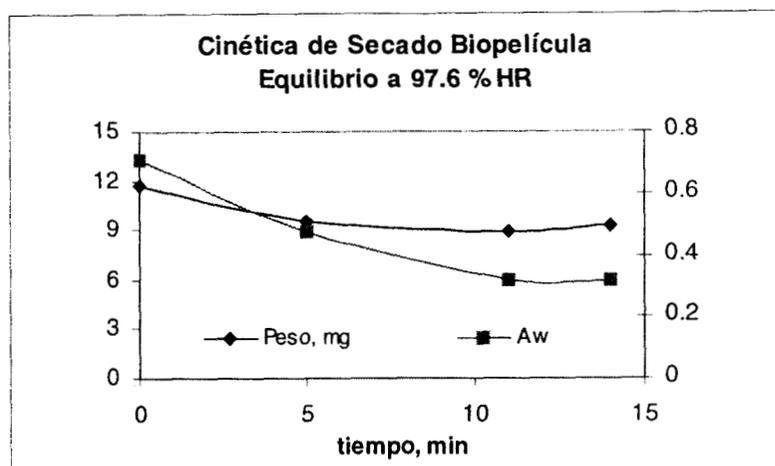


Fig. 5.6.9. Cinética de secado de biopelícula sometida a 98 % HR.

En conclusión, las determinaciones de cinéticas de secado estático e isothermas de desorción de agua en biopelícula se realizaron por gravimetría y por mediciones de actividad de agua. Los resultados obtenidos mostraron que las mediciones de Aw son más sensibles y permitieron diferenciar las fases en las curvas de secado. Las cinéticas de secado de biopelícula sobre distintos soportes señalaron que la mayor producción de biomasa se presentó sobre acero inoxidable en relación a polipropileno y PVC. La isoterma de desorción de agua se definió midiendo el cambio en el contenido de humedad de biopelícula sometida a atmósferas de 32 % HR a 100% HR. Se propuso el modelo  $Y = aX/(1-X)$  para la isoterma de desorción y se ajustaron los datos a la isoterma de BET. Los ajustes fueron buenos para Aw menor a 0.84 inclusive y se estimó necesario un contenido de humedad de 75% base húmeda para Aw cercana a 1 en la biopelícula. Se determinó una cinética de secado de biopelícula a 100% HR por gravimetría y Aw simultáneamente, definiéndose dos grandes fases de secado. La primera tomó 30 min., la Aw era elevada y hubo una disminución importante en el contenido de humedad, todo ello indicio de agua libre o débilmente enlazada. En la segunda, la Aw fue menor a 0.84 y la variación en el contenido de humedad fue mínima, lo cual corresponde a agua fuertemente enlazada. Se repitió el ensayo para biopelícula a 97% HR encontrándose que el contenido de agua inicial determina las curvas de secado.

## 5.7 Hidrofobicidad de células constituyentes de biopelícula

El lecho de un biofiltro debe retener cierto contenido de agua al mismo tiempo de mantenerla disponible para la actividad microbiana, pero se ha encontrado que la composta aumenta considerablemente su hidrofobicidad al desecarse, volviendo difícil su rehumectación (Cárdenas, et. al. 1998; Devinny, 1999). El fenómeno que asocia la desecación de la fase biológica en el lecho filtrante, su hidrofobicidad y su capacidad de rehumectación aún no ha sido estudiado.

En el presente trabajo se utilizó el método MATH para cuantificar la hidrofobicidad de las células constituyentes de biopelícula bajo diferentes condiciones de humedad relativa, sobre distintos soportes sintéticos, y utilizando dos fuentes de carbono distintas. El método MATH se ha empleado para determinar la hidrofobicidad en cultivos puros de bacterias (Rosenberg, 1980), en conidios (Boucias, 1988), en hongos como *A. fumigatus* (Peñalver, 1996), para estudiar el efecto de los iones en la hidrofobicidad de la superficie celular (Bunt, 1995). También se ha empleado con muestras de lodos activados tras un pretratamiento (Guellilil, 1998).

El índice de hidrofobicidad de biopelícula desecada por equilibrio con diversas atmósferas de humedad relativa controlada se muestra en la Fig. 5.7.1. En ella se observa que dicho índice disminuyó directamente con el porcentaje de humedad relativa, es decir, entre más desecada se encontraba la biopelícula (32 % HR), mayor fue su hidrofobicidad ( $A_f / A_o = 0.5$ ), como se esperaba. La desecación se efectuó sobre película íntegra, y el ensayo hidrofobicidad en las células correspondientes lavadas, esto parece indicar que la cubierta de sustancias exopoliméricas no evitó la extracción de moléculas de agua por la solución salina saturada. Debe preguntarse entonces hasta que grado, la eliminación de moléculas de agua, alteró la estructura de la célula; si tuvo efecto sobre las proteínas de membrana (hidrofobinas, hidrofilinas), sobre su energía libre de superficie o sobre su carga neta superficial, incluso tal vez, en el agua intracelular, para dar respuesta a estas preguntas se requieren ensayos más precisos y específicos. Dadas la sensibilidad y limitaciones del método empleado es recomendable utilizar más de una técnica para confirmar los resultados obtenidos.

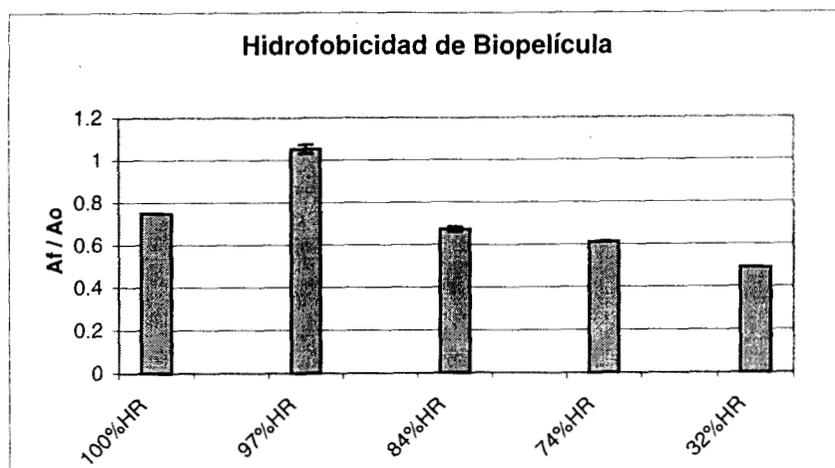


Figura 5.7.1. Hidrofobicidad de biopelícula con diferente contenido de humedad.

Como se observa en la Fig. 5.7.2, existe una diferencia en la hidrofobicidad de las células de biopelícula formada sobre polipropileno y sobre acero inoxidable, sin embargo, un análisis estadístico señala que no hay evidencia suficiente para afirmar que difieren (Anexo 8.7). Es posible que las células sobre polipropileno sean más hidrófobas que aquéllas sobre acero inoxidable, lo que indicaría una relación entre la hidrofobicidad del soporte y la desarrollada por las células. Se ha estudiado el desarrollo de biopelículas sobre soportes sólidos de diversa hidrofobicidad (Shreve, et.al. 1991), midiendo la biomasa total formada y la velocidad de formación de biopelícula, en esa investigación se encontró que las superficies hidrófobas presentaron el 50% de biomasa formada en superficies con carga neta positiva o negativa y que la menor formación de biopelícula se dio en soportes hidrófilos, sin embargo, no se investigaron las propiedades de la biopelícula formada. Por otra parte, las células cultivadas en suspensión mostraron el mayor índice de hidrofobicidad, i.e. son las menos hidrófobas, esto se explica por el contacto continuo con una fase líquida lo cual evitó su secado, también es posible que la diferencia en los métodos de cultivo (fijo y suspendido), haya alterado las características de superficie de la célula.

El índice de hidrofobicidad de biopelícula sobre acero inoxidable (0.7) es menor al medido con biopelícula a 100% de humedad relativa (0.75), lo cual indica que posiblemente aún a 100% HR, hay desecación de la biopelícula.

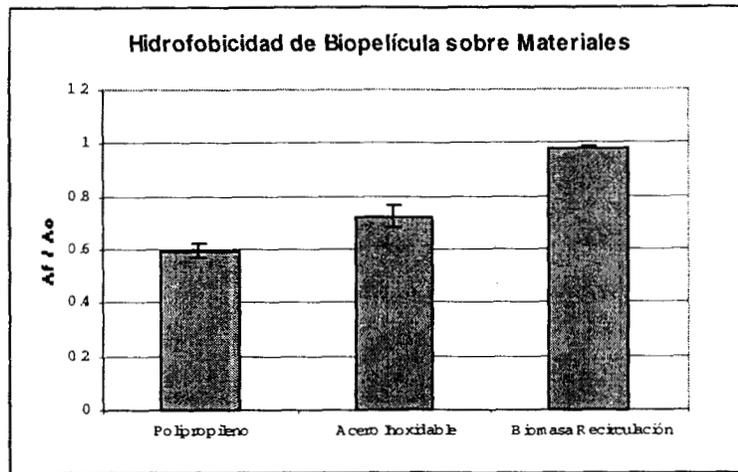


Figura. 5.7.2. Hidrofobicidad de biopelícula formada sobre distintos soportes.

Para evaluar el efecto del sustrato en la hidrofobicidad celular se emplearon dos fuentes de carbono, glucosa y tolueno en cultivos en suspensión. En la Fig. 5.7.3 se observa que existe diferencia significativa (Anexo 8.7) en la hidrofobicidad medida con  $0.883 \pm 0.018$  para glucosa y  $0.805 \pm 0.038$  para tolueno, esto tal vez indica que células creciendo con un sustrato más hidrófilo serán más hidrófilas. Convendría en este caso realizar un barrido de sustratos con hidrofobicidad gradual. El valor obtenido para células con glucosa 0.9, es cercano al obtenido con biomasa de recirculación 0.97 en donde también se utilizó glucosa, lo cual da un indicio de la exactitud del método.

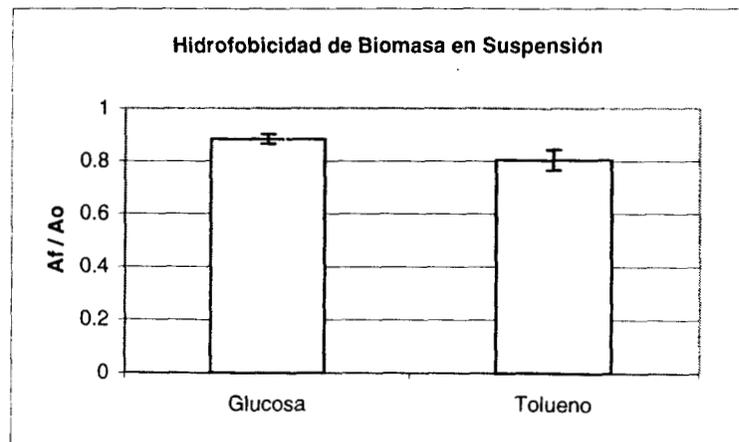


Figura. 5.7.3. Hidrofobicidad de biomasa en suspensión cultivada con distintos sustratos.

Resumiendo, la hidrofobicidad de células se determinó con el método de separación en fase orgánica: fase acuosa para biopelícula con diferentes grados de desecación, creciendo sobre distintos soportes y creciendo con distintos sustratos. La hidrofobicidad aumentó proporcionalmente con el grado de desecación. Las diferencias en la hidrofobicidad de biopelícula sobre acero inoxidable y polipropileno no son significativas, sin embargo, respecto a células libres si difiere, en este caso las células en suspensión presentaron la menor hidrofobicidad posiblemente debido al método de cultivo. Respecto al sustrato, se observó que la hidrofobicidad de células en suspensión creciendo con tolueno fue significativamente mayor a la de células creciendo con glucosa, esto indica que posiblemente la hidrofobicidad del sustrato influye en la de la célula.

## 6. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la desecación de biopelícula sobre acero inoxidable en sus propiedades físicas y biológicas, para lo cual se establecieron las técnicas analíticas que permitieran medir y cuantificar adecuadamente dicho efecto, entre las cuales se encuentran observaciones en microscopía de barrido electrónico, mediciones de respirometría para actividad biológica, isotermas de adsorción de tolueno y de desorción de agua, además de mediciones de hidrofobicidad celular.

Los resultados experimentales mostraron que el consumo de tolueno y oxígeno por la biopelícula, disminuye con su grado de desecación hasta actividad nula con un cambio crítico entre 97% HR y 84% HR, debido posiblemente a la menor difusión de substratos, por disminución en la película de agua y por la transformación del glicocálix en estructuras más rígidas e hidrofóbicas, además del posible efecto en la actividad enzimática.

No obstante, la rehumectación de biopelícula desecada permite recuperar su actividad biológica en función del grado de desecación y el método de rehumectación, indicando un efecto reversible de secado en sistemas de biofiltración de aire.

Por otra parte, las cinéticas e isotermas de desorción de agua muestran claramente que el punto en el que cambia la forma de unión entre las moléculas de agua y la biopelícula es en  $A_w$  0.84, en valores menores el agua está débilmente enlazada y en valores mayores, fuertemente enlazada, lo cual coincide con la actividad biológica de biopelícula desecada y de biopelícula rehumectada.

La utilización de los conocimientos generados durante el presente trabajo permitirán evaluar y predecir el desarrollo de sistemas de biopelícula expuestos al fenómeno de secado, como son los biofiltros para tratamiento de aire contaminado.

Reflexionando sobre las posibilidades de complementar este trabajo, se puede mencionar que dado el amplio intervalo de humedad relativa en el cual se encontraron diferencias importantes, sería útil estudiar las propiedades de la biopelícula con un gradiente más pequeño dentro del mismo. Aunque los biofiltros son colonizados principalmente por bacterias, la presencia de especies fúngicas podría alterar su operación debido a su capacidad de subsistir a baja actividad de agua, sería muy útil el estudio de biopelículas conteniendo hongos, pues

podría señalar la forma de construir biofiltros más resistentes a la desecación. Y por último, sería recomendable estudiar condiciones de secado dinámicas y realizar ensayos de rehumectación que se aproximen mejor a la ingeniería de procesos empleada en los sistemas de biofiltración.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Acuña, E., Auria, R., Pineda, J., Pérez, F., Morales, M., Revah, S. (1996). Studies on the microbiology and kinetics of a biofilter used to control toluene emissions. Marshall, K. C. (1997). *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 89 th. Annual Meeting & Exhibition, Nashville, TN.
2. Acuña, M. A., Pérez, F., Auria, R., Revah, S. (1999). Microbiological and kinetic aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotechnol. Bioeng.* 63(2):175-184.
3. Arcangeli, J. P., Arvin, E. (1992). Modelling of toluene degradation and biofilm growth in a fixed biofilm reactor. *Wat. Sci. Techn.* 26(3-4):617-626.
4. Auria, R., Aycaguer, A., Devanny, J. S., 1998. Influence of water content on degradation rates for ethanol in biofiltration. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 48:65-70.
5. Bakken, L. R., Olsen, R. A. (1983). Buoyant densities and dry matter contents of microorganisms: conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(4):1188-1195.
6. Bohn, H. (1992). Consider biofiltration for decontaminating gases. *Chem. Eng. Prog.* April:34-40
7. Bohn, H., Bohn, K. H. (1999). Moisture in biofilters. *Environ. Progress.* 8(3):156-161.
8. Bond, R. D., Harris, J. R. (1964). The influence of the microflora on physical properties of soils. *Aust. J. Soil. Res.* 2:111-122.
9. Boucias, D. G., Pendland, J. C., Latge ; J. P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(7):1795-1805.
10. Bryers, J. D., Drummond, F. (1998). Local macromolecule diffusion coefficients in structurally non-uniform bacterial biofilms using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Biotechnol. & Bioeng.* 60(4):46-473.
11. Bunt, C. R., Jones, D. S., Tucker, I. G. (1995). The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* evaluated by the BARH and HIC methods. *International journal of pharmaceuticals.* 113:257-261.

12. Cárdenas-González, B., Ergas, S. J., Switzenbaum, M. S., Philibert, N. (1998). *Air & Waste Manage. Assoc.* 89 th. Annual Meeting & Exhibition, San Diego, CA.
13. Cheftel, J. C., Cheftel, H. (1976). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol I. Ed. Acribia Zaragoza, España.
14. Cox, H. H. J., Magielsen, F. J., Doddema, H. J., 1996. Influence of the water content and water activity on styrene degradation by *Exophiala jeanselmei* in biofilters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:851-856.
15. Del Puerto Q. C., Molina, E. E. (1992). La contaminación del aire y sus riesgos para la salud en Contaminación del aire y salud. Serie Salud Ambiental. Instituto Nacional de Higiene y Epidemiología y Microbiología. Cuba.
16. Devanny, J. S., Deshusses, M. A., Webster, T. S. (1999). Biofiltration for air pollution control. Lewis Publishers, N. Y., E. U. A.
17. Duncan-Hewitt, W. C. (1990). Nature of the Hydrophobic Effect. En Microbial Cell Surface Hydrophobicity. R. J. Doyle & Mel Rosenberg, editores. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Emerson, W. W., Bond, R. D. (1962). The rate of water entry into dry sand and calculation of the advancing contact angle. *Aust. J. Soil Res.* 1(1):159-163.
19. Fletcher, M., Marshall, K. C., (1982). Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(1):184-192.
20. Gabler, R. (1978). Electrical interactions in molecular biophysics. Ed. Academic Press. N.Y.
21. Gómez-Puyou, A., Tuena, G. P. M. (1996). Agua y enzimas en Fronteras en biotecnología y Bioingeniería. Enrique Galindo editor. SMBB, A.C.
22. Gostomski, P. A., Sisson, J. B., Cherry, R. S., (1997). Water content dynamics in biofiltration: the role of humidity and microbial heat generation. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 47:936-944.
23. Guellil, A., Block, J. C., Urbain, V. (1998). Adaptation of the microbial adhesion to hydrocarbon test (MATH) for measuring activated sludge hydrophobicity. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5):359-362.

24. Heitkamp, M. A., Adams, W. J., Camel, V., (1993). Evaluation of five biocarriers as supports for immobilized bacteria: comparative performance during high chemical loading, acid shocking, drying and heat shocking. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:1013-1023.
25. Hillel, D. (1980). Fundamentals of soil physics. Academic Press Inc., N. Y., E.U.A.
26. INEGI, SEMARNAP (1998). Estadísticas del Medio Ambiente. México. 1997.
27. Jones, D. S., Gorman, S. P., Mc Cafferty, D. F., Woolfson, A. D. (1991). The effects of three non-antibiotic, antimicrobial agents on the surface hydrophobicity of certain microorganism evaluated by different methods. *J. Appl. Bacteriol.* 71:218-227.
28. Jorand, F., Boué-Bigne, F., Block, J. C., Urbain, V. (1998). Hydrophobic/Hydrophilic poroperties of activated sludge exopolymeric substances. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5):307-315.
29. Karanfil, T, Kilduff, J. E. (1999). Role of granular activated carbon surface chemistry on the adsorption of organic compounds. *Env. Sci. Technol.*, 33(8):3217-3224.
30. King, P. M.(1981). Comparasion of methods for measuring severity of water repellence of sandy soils and assessment of some factors that affect its measurement. *Aust. J. Soil Res.* 19:275-285.
31. Lachman, L., Lieberman, H. A., Kanig, J. L. (1986). The theory and practice of industrial pharmacy. 3<sup>a</sup>. ed. Ed. Lea & Febiger. N.Y., USA.
32. Lau, Y. L., Liu, D. (1993). Effect of flow rate on biofilm accumulation in open channels. *Wat. Res.*. 27(3):355-360.
33. Lazarova, V. Manem, J. (1995) Biofilm characterization and wastewater treatment. *Water Res.* 29(10):2227-2245.
34. Leson, G., Winer, A.M. (1991). Biofiltration:an innovative air pollution control technology for VOC emissions. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 41(8):1045-1054.
35. Lowell, S., Shields, J. E. (1991). Powder surface area and porosity. 3<sup>a</sup>. Ed.Chapman & Hall. London.
36. Marshall, K .C. (1997). Colonization, adhesion, and biofilms en Manual of Environmental Microbiology. C. J. Hurst, G. R. Kundsén, M. J. Mcinerneey, L. D. Stetzenbach, M. V. Walterr editors. ASM
37. Mycock, J. C., McKenna, J. D., Theodore, L. (1995). Handbook of air pollution control engineering and technology. Lewis Publishers, NY.

38. Mirpuri, R., Jones, W., Bryers, J. D. (1997). Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol. Bioeng.* 53(6):535-546.
39. Morales, M. Revah, S., Auria, R. (1998). Start-up and the effect of gaseous ammonia additions on a biofilter for the elimination of toluene vapors. *Biotechnol. Bioeng.* 00(00):00-00.
40. Ostlie-Dunn, T. L., Mattson, S. R., Domack, R., Newell, J. A., Scott, A. M., Kozliak, E. I. (1998). Filter-based trickle bed bioreactors for air purification en proceedings USC-TRG Conference on biofiltration . October 22 y 23 LA, Cal. USA.
41. Palenik, B., et. al. (1989). Structure and function of biofilms en Structure and Function of Biofilms, W. G. Characklis & P. A. Wilderer eds., Report of the Dahlem Workshop. Structure and Function of Biofilms, Berlin 1988. John Wiley & Sons
42. Pedersen, A. R., Moller, S., Molin, S., Arvin, E. (1997). Activity of Toluene-Degrading *Pseudomonas putida* in the early growth phase of a biofilm for waste gas treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 54(2):131-141
43. Pedersen, K. (1982). Method for studying microbial biofilms in flowing-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:6-13.
44. Peleg, M. (?). Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. Univ of Massachusetts, Amherst, MA USA.
45. Peñalver, M. C., Casanova, M., Martínez, J. P., Gil, M. L. (1996). Cell wall protein and glycoprotein constituents of *Aspergillus fumigatus* that bind to polystyrene may be responsible for the cell surface hydrophobicity of the mycelium. *Microbiology*, 142:1597-1604.
46. Revah, S., Pérez, F., Auria, R. (1996). Generalidades sobre procesos de purificación biológica de aire/gases. En Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales. Instituto de Ingeniería . UNAM. Pp 17-22.
47. Rittman, E., Crawford, L., Tuck, C., Namkung, E. (1986). In situ determination of kinetic parameters for biofilms: isolation and characterization of oligotrophic biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 28:1753-1760.

48. Rosenberg, M. , Doyle, R. J. (1990). Microbial Cell Surface Hydrophobicity: History, Measurement, and Significance. En *Microbial Cell Surface Hydrophobicity*. R. J. Doyle & Mel Rosenberg, editores. American Society for Microbiology, Whashington, D.C.
49. Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology letters*. 9:29-33.
50. Ruiz, J., Bilbao, R., Murillo, M. B., (1999). Convective transport and removal of vapors of two volatile compounds in sand columns under different air humidity. *Environ. Sci. Technol.* 33(21): 3774-3780.
51. Sabo, F., Schneider, T., Bernecker, K. (1998). Latest developments in biological air pollution control en *Proceedings USC-TRG. Conference on Biofiltration* . October 22 y 23 LA, Cal. USA.
52. Santegoeds, C. M., Ferdelman, T. G., Muyzer, G. De Beer D. (1998). Structural and functional ddynamycs of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10):3731-3739.
53. Sasahara, K. C., Zottola, E. A. (1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganizms in flowing systems. *J. Food Protection.* 56(12):1022-1028.
54. Schmitt, J., Flemming, H.C. 1999. Water binding in biofilms. *Wat. Sci. Technol.* 39(7):77-82.
55. Shreve, G. S., Olsen, R. H., Vogel, T. M. (1991). Development of pure culture biofilms of *P. putida* on solid supports. *Biotechnol. Bioeng.* 37(15):512-518.
56. Siebel, M. A., Characklis, W. G. (1991). Observations of binary population biofilm. *Biotechnol. Bioeng.* 37:778-789.
57. Stewart, P. S. (1993). A model of biofilm detachment. *Biotechnol. Bioeng.*41(1):111-117.
58. Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D. (1999). Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol. Bioeng.* 65(1):83-92.
59. Straver, M. H., Kijne, J. W. (1996). A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of Brewer's yeast cells. *Yeast* 12:207-213.

60. Tell, J. G., Uchrin, C. G. (1991). Relative contributions of soil humic acid and humin to the adsorption of toluene onto an aquifer solid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 47(4):547-554.
61. Valat, B., Jouany, c., Riviere, L. M. (1991). Characterization of the wetting properties of air-dried peats and compost. *Soil Science*.152(2):100-107.
62. Van Groenestijin, J. W., Hesselink, P. G. M. (1993). Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation*. 4:283-301.
63. Van Lith, C., Leson, G., Michelson, R. (1997). Evaluating design options for biofilters. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 47(1):37-48.
64. Villaverde, S., Mirpuri, R. G., Lewandowski, Z., Jones, W. L. (1997). Physiological and chemical gradients in a *Pseudomonas putida* 54 G biofilm degrading Toluene in a flat plate vapor phase bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 56(4):361-371.
65. Wilderer, P. A., Characklis, W. G. (1989). Structure and function of biofilms en Structure and Function of Biofilms, W. G. Characklis & P. A. Wilderer eds., Report of the Dahlem Workshop pm Structure and Function of Biofilms, Berlin 1988. John Wiley & Sons.
66. Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, Ch., McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4035-4039.
67. Zhang, X. Q., Bishop, P. L., Kupferle, M. J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Wat. Sci. Technol.* 37(4-5):345-348.
68. Asmusa(1999). <http://www.asmusa.org/edusrc/edu341.htm>
69. Semanap (1998). <http://www.semarnap.gob.mx>

## 8. ANEXOS

### 8.1 Soluciones

#### A) Amortiguador PUM. PH 7.1 (Rosenberg, 1980)

COMPUESTO	CANTIDAD
Agua destilada	1000 mL
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	22.2 g
$KH_2PO_4$	7.26 g
Urea	1.8 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g

#### B) Soluciones salinas para desecación de biopelícula

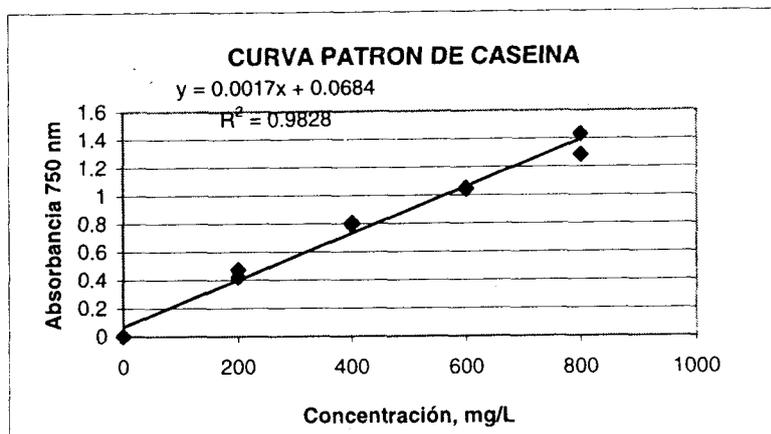
SOLUCIONES SALINAS	%HR
Ninguna	100.1
$K_2SO_4$	97.4
KCl	83.9
NaCl	74.8
$MgCl_2$	32

Preparación del amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4.

1. Preparar solución 0.2 M de  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , disolviendo 27.6 g en 1000 mL de agua destilada en matraz volumétrico.
2. Preparar solución 0.2 M de  $Na_2HPO_4$ , disolviendo 28.39 g en 1000 mL de agua destilada en matraz volumétrico.
3. Adicional el ácido a la sal para ajustar a pH 7.4. Se llega a una relación de 81:19 con  $Na_2HPO_4:NaH_2PO_4$
4. Diluir a 2000 mL con agua destilada.

## 8.2 Mediciones con curvas patrón

A) Para determinar proteína por el método de Lowry se utilizó una curva patrón de caseína.



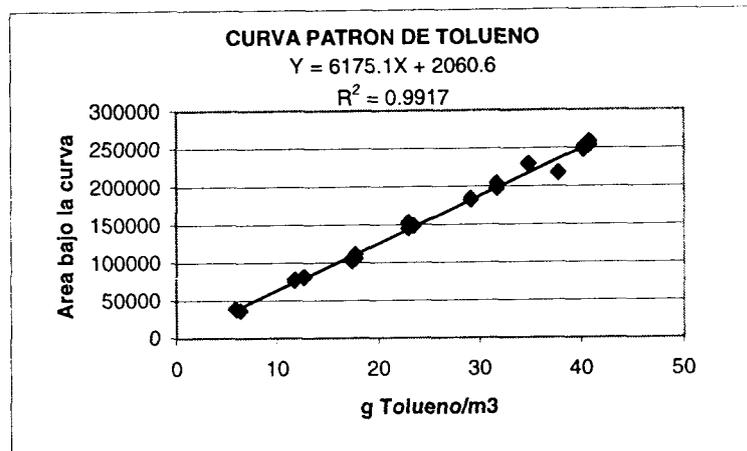
Las mediciones de absorbancia solo son válidas hasta valores de 0.8. La técnica empleada se describe a continuación.

1. Solución estándar de caseína, 0.5 mg/mL. Hidrolizar con ácido y neutralizar con NaOH.
2. Preparar curva estándar

TUBO	SOL. CASEÍNA (ML)	AGUA (ML)	CONC. FINAL (MG/ML)
1	0	1	0
2	0.2	0.8	0.1
3	0.4	0.6	0.2
4	0.6	0.4	0.3
5	0.8	0.2	0.4
6	1	0	0.5

3. Hidrolizar la biomasa, agregando 1 mL de NaOH 1N a cada tubo, no agitar. Ebulir por 5 minutos. Enfriar rápidamente.
4. Preparar la solución de reacción mezclando 1 mL de Sulfato de cobre 1% con 1 mL de tartrato doble de sodio y potasio 2%.
5. Agregar la mezcla anterior a 50 mL de solución de carbonato de sodio al 2%. Calentar ligeramente.
6. Adicionar 5 mL de la mezcla de reacción a cada tubo. Agitar y reposar 10 min en oscuridad.
7. Adicionar 1 mL de Folin diluido 1:1 con agua a cada tubo. Agitar y reposar por 30 minutos en oscuridad.
8. Leer absorbancia a 590 nm.

B) La medición del tolueno en la fase gas en los ensayos de actividad biológica se realizó empleando una curva patrón de tolueno.



En frascos erlenmeyer de 125 mL tapados con válvulas mininert, se colocaron 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60, 0.75 y 3.0 g de biopelícula extraída de las placas de acero inoxidable, desecada a 70°C por 24 horas y homogenizada en mortero de porcelana.

Se adicionó a cada frasco 5  $\mu$ L de tolueno líquido y se colocaron en una estufa a 30°C. Se realizaron lecturas del tolueno en la fase gaseosa a las 48, 87 y 109 horas para asegurar el equilibrio del tolueno entre la fase gas y el adsorbido en la biomasa.

En el caso de las isotermas de acero inoxidable y polipropileno, se colocaron un número ascendente de placas, de 0 a 5 placas, con peso total de 0 a 10 g y de 0 a 2 g aproximadamente para acero y para polipropileno respectivamente y se siguió el mismo procedimiento descrito.

### 8.3 Metodología empleada para SEM

Las muestras se fijaron en solución de glutaraldehído al 2% en un amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4 por 2 h, fueron lavadas dos veces con el mismo amortiguador y postfijadas por 1 h en amortiguador de fosfatos conteniendo 1% de OsO<sub>4</sub>.

Las muestras se lavaron dos veces con el amortiguador antes de la deshidratación con etanol.

Las muestras se deshidratan con soluciones alcohólicas a varias concentraciones: 2 cambios de

15 min con soluciones de etanol a 30, 50, 70, 80, 90 y 100%. Evitar dejar secar la muestra con alcohol y evitar abrir los viales de muestras a baja temperatura para evitar su rehumectación.

Al desecar las muestras en soluciones de distintas concentraciones de etanol, es posible conservarlas por periodos largos (12 h) en etanol al 70% o bien al 100%

Las muestras se secaron finalmente en un desecador de punto crítico (Samdri-780 B, Tousimis Research Corp., Rockville MD) empleando CO<sub>2</sub> y fueron cubiertas con oro.

La examinación se llevó a cabo en un microscopio de escaneo electrónico digital (JSSM-5900 Japan) usando 8 kV.

Se limpió el portaobjetos metálico con acetona, se pulió con pasta formulada para ese propósito. Se colocó cinta de carbón para adherir las muestras y se colocaron sobre dicha cinta. Posteriormente se cubrieron con un baño de partículas de carbon y con un baño de oro.

Para emplear el microscopio :

1. Eliminar el vacío en la cámara de bombardeo de electrones
2. Existen dos sistemas
  - a) BES, Back Electron system. Sistema de electrones retrodispersos
  - b) SEI, Secondary Electron Image
3. Ajustar el voltaje según la muestra. Se elige entre el rango de 0.8 a 30 kV. Para material biológico 8 kV.
4. Ubicar la muestra con el software
5. Elegir el Scan de 1 a 4. El 3 da mayor resolución pero ocupa mayor espacio
6. Salvar imagen con extensión bmp con Merge text.

#### 8.4 Modelo logístico de Gompertz

El modelo integrado de Gompertz es una ecuación de tipo logística de la forma

$$Sc = \alpha \exp[-\beta \exp(-\kappa t)] \quad (1)$$

Esta se obtuvo de la ecuación diferencial

$$\frac{dSc}{dt} = -\kappa Sc \log \frac{Sc}{\alpha} \quad (2)$$

al obtener la segunda derivada es posible identificar la tasa de cambio de consumo de substrato

$$\frac{d^2 S_c}{dt^2} = \kappa \left( \log \frac{S_{co}}{\alpha} + 1 \right) \frac{dS_c}{dt} \quad (3)$$

$S_c = \alpha/e$  en el punto de inflexión cuando la ecuación (3) se iguala a cero, lo cual corresponde al máximo valor de  $\frac{dS_c}{dt}$  o máxima tasa de consumo de substrato  $V_{max}$ . Esta puede obtenerse substituyendo  $S_c = \alpha/e$  en la ecuación (2)

$$V_{max} = \frac{dS_c}{dt}_{max} = -\kappa(\alpha/e) \log[(\alpha/e)/e] = \frac{\kappa\alpha}{e} = 0.368\kappa\alpha \quad (4)$$

La máxima tasa de consumo de tolueno  $V_{max}$  de la ecuación (4) corresponde a la tasa más alta obtenida mediante el ajuste de los datos de substrato consumido  $S_c$  en los ensayos y puede no considerar la reducción en la tasa según la concentración en la fase gas va disminuyendo. En este sentido se considera una relación de orden cero.

La ventaja de usar el modelo de Gompertz es que se reduce el error de tratar de ajustar a una línea recta los datos experimentales para obtener la velocidad.

### 8.5 Análisis estadístico. Constantes cinéticas en el modelo de Gompertz

Análisis de varianza de un factor para probar que existe al menos un nivel de humedad relativa que produce una velocidad específica de consumo de substrato diferente.

DATOS.

k velocidad específica de consumo de substrato.

99.6% HR	99.3%HR	97.2% HR	96.2% HR	94.6% HR	91.8% HR
0.418676588	0.34	0.45548328	0.37699304	0.44998955	0.46170277
0.433550172	0.34	0.48553199	0.30750624	0.45343499	0.26286022

Coef.correlación

0.06811605

	%HR	K
%HR	1	
K	0.06811605	1

## RESUMEN

GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
99.6	2	0.85222676	0.42611338	0.00011061
99.3	2	0.67995436	0.33997718	1.0414E-09
97.2	2	0.94101527	0.47050763	0.00045146
96.2	2	0.68449928	0.34224964	0.00241421
94.6	2	0.90342454	0.45171227	5.9355E-06
91.8	2	0.724563	0.3622815	0.01976918

## ANÁLISIS DE VARIANZA

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F	PROBABILIDAD	VALOR CRÍTICO F
Entre grupos	0.033358763	5	0.00667175	1.75947498	<b>0.25516526</b>	4.38737402
Dentro de los grupos	0.022751398	6	0.0037919			
Total	0.056110161	11				

Ho: Todas las medias son iguales

Ha: Al menos una media difiere de las restantes

Conclusión: No hay evidencia suficiente para afirmar que al menos una media difiere.

## 8.6 Validación de la técnica de hidrofobicidad

Se validó el método de MATH (Rosenberg, et. al. 1980) para medir hidrofobicidad de un cultivo mixto compuesto por 5 bacterias y 2 levaduras.

## **Método**

Durante el proceso se utilizó una suspensión de células a partir de la biopelícula, ésta se extrajo raspando el soporte con espátula, se homogenizó y resuspendió. En la validación de la concentración inicial se usaron células del cultivo líquido de recirculación.

Concentración inicial. Para validar la necesidad de realizar el ensayo de partición bifásica con una concentración particular de células, se realizaron diluciones a partir de una suspensión celular concentrada y se siguió el procedimiento de Rosenberg (1980), que se describe dentro del manual de técnicas.

Lavado de células. Se realizó el ensayo de partición bifásica en suspensiones celulares con 2 lavados con solución amortiguadora PUM y sin lavar, con objeto de valorar la influencia de este paso dentro de la técnica.

Tiempo de agitación. Se evaluaron dos tiempos de agitación, 60 y 120s en el marco de procedimiento de partición bifásica, empleando una proporción 2:1 de suspensión celular acuosa:fase orgánica.

Periodo de incubación. Se probó el efecto de la etapa de incubación a 30°C de las fases, efectuando el ensayo incluyendo y sin incluir esa etapa.

Tiempo de separación de fases. A fin de evaluar la influencia del tiempo de separación de fases, se realizaron los ensayos dejando transcurrir 15 y 30 minutos antes de realizar las lecturas de absorbancia de la fase acuosa.

## **Resultados**

La concentración inicial de células no influye en las mediciones de hidrofobicidad como se puede observar en la Fig. 1. Para las diluciones obtenidas a partir de la misma suspensión de células, no se encontró diferencia en la hidrofobicidad medida ( $R^2 = 0.0821$ ).

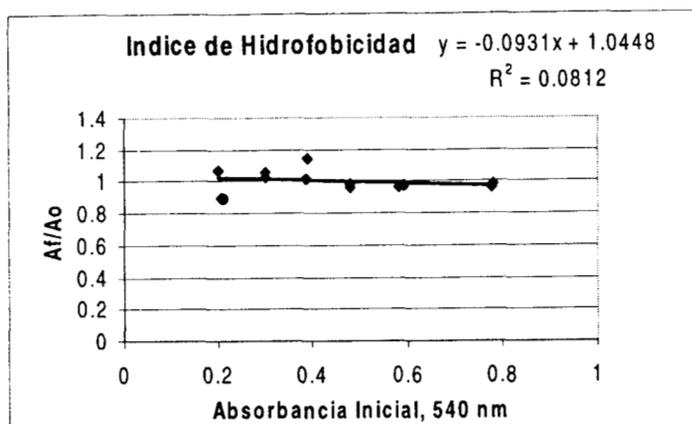


Fig. 1. Índice de HFB determinado en suspensiones celulares de distintas concentraciones.

Al realizar los ensayos con células lavadas previamente y sin lavar, no se encontró diferencia en la hidrofobicidad medida, como se muestra en la Tabla 1. Esto puede explicarse por las condiciones empleadas en el presente trabajo para la obtención de células, la extracción y resuspensión de células de biopelícula pudo haber igualado las condiciones de un cultivo en suspensión.

El material que rodea a las células de cultivos en suspensión, i.e. sustancias extracelulares poliméricas, se disuelve y difunde en el medio líquido circundante. En el caso de células cultivadas sobre una superficie sólida en donde forman una biopelícula, dichas sustancias exopoliméricas podrían tener influencia en la hidrofobicidad medida en caso de omitir el lavado de células. Es necesario ampliar el trabajo en este aspecto particular.

Tabla 1. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

Ho: La media muestral del Índice de HFB de células sin lavar es igual a la media muestral del Índice de HFB de células con dos lavados.

	SIN LAVAR	DOS LAVADOS
Media	0.681395349	0.623218764
Varianza	0.007017583	0.004285036

Continuación Tabla 1. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

Observaciones	5	4
Varianza agrupada	0.005846491	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
Estadístico t	1.134212185	
P(T<=t) una cola	0.147024433	
Valor crítico de t (una cola)	1.894577508	
P(T<=t) dos colas	<b>0.294048866</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2.36462256	

Conclusión: Los datos experimentales no proporcionan evidencia suficiente para rechazar  $H_0$ .

El tiempo de agitación resultó tener alta influencia en los resultados obtenidos. La uniformidad, tiempo y modo de mezclar las fases influye en la medición de hidrofobicidad. Se determinó la conveniencia de emplear vórtex tipo plancha cuando se realizan duplicados.

Existe una correlación entre el tiempo de mezclado de las fases y el volumen de fase orgánica empleada. Diversos autores han modificado el método desarrollado por Rosenberg, et. al. (1980) aumentando el tiempo de mezclado y disminuyendo la fase orgánica y viceversa, según se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Diversas condiciones empleadas en la técnica de partición bifásica para determinar hidrofobicidad en células.

MUESTRA	TIEMPO DE MEZCLADO	VOL. CELULAS/ VOL. SOLVENTE	REFERENCIA
Bacterias	120 s	1.2 / 0.7	Rosenberg, 1980
E. coli	5 min	6 / 0.7	Bunt, 1995
A. fumigatus	3 min	2 / 0.3	Peñalver, 1996
Conidios	10-15 s	3 / 3	Boucias, 1988
Bacterias	60 s	4.8 / 1.8	Jones, 1991

Durante los ensayos con incubación de las fases a 30°C y sin incubación, se observó que la incubación resulta en una menor dispersión de los resultados. La homogenización de temperatura entre las fases permite igualar sus energías internas y posteriormente un mejor mezclado entre las fases.

Se observó que el tiempo de separación de fases tiene alta influencia en la medida de absorbancia de la fase acuosa. Esto puede deberse a la sedimentación de células cuando se les deja por largos periodos en la celdilla o tubo de mezclado. En la Tabla 3 se muestra la existencia de una diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ) entre la hidrofobicidad medida después de 15 y 30 min de separación de las fases.

Tabla 3. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

Ho: La media muestral del Índice de HFB transcurridos 15 min es igual a la media muestral del Índice de HFB transcurridos 30 min.

	15 MIN	30 MIN
Media	0.6584786	0.60718851
Varianza	0.0006282	0.00041355
Observaciones	4	4
Varianza agrupada	0.0005209	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	3.1781568	
P(T<=t) una cola	0.0095602	
Valor crítico de t (una cola)	1.9431809	
P(T<=t) dos colas	<b>0.0191204</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	2.4469136	

Conclusión: Los datos experimentales muestran que las medias muestrales del Índice de HFB transcurrido un tiempo de 15 min y un tiempo de 30 min son diferentes.

Una vez transcurridos 15 min de separación de fases, se mantuvo la celdilla dentro del espectrofotómetro para obtener una lectura continua de absorbancia y se observó que ésta disminuía permanentemente, por lo cual se estableció la necesidad de mantener gran exactitud en el periodo de separación de fases.

No se realizaron ensayos para evaluar la proporción fase acuosa:fase orgánica, sin embargo en los experimentos realizados por Rosenberg, et. al. (1980) se encuentra que para una proporción mayor a 2:1 fase acuosa:fase orgánica se obtiene una condición de saturación, de manera que para una proporción mayor no se obtendrá una mayor partición de microorganismos entre las fases.

La longitud de onda empleada debe ser determinada previamente para el cultivo celular particular. Se sabe que en diferentes etapas de crecimiento los microorganismos tienen diferentes coeficientes de extinción por lo cual resulta necesario ser consiste en la fase de crecimiento seleccionada para realizar el ensayo.

### **Conclusiones**

La determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular puede ser indicativa de la afinidad de microorganismos por substratos orgánicos hidrofóbicos, así como de la capacidad de formar biopelícula sobre soportes hidrofóbicos.

El método de partición bifásica para medir hidrofobicidad de células desarrollado por Rosenberg, et. al. (1980) es simple, barato y factible de ser empleado con varios tipos de muestras.

Durante su validación se encontró que la concentración inicial de células no influye en la hidrofobicidad medida. Por otra parte, se observó que el método es altamente sensible al tiempo y modo de agitación, así como también al tiempo en que se permite la separación de fases.

## 8.7 Análisis estadístico. Ensayo de Hidrofobicidad.

A ) Análisis de varianza de un factor para probar que existe al menos un nivel de humedad relativa que produce un índice de hidrofobicidad diferente.

### DATOS

100% HR	97% HR	84% HR	74% HR	32% HR
0.86930091	0.817351598	0.65637066	0.59386282	0.61832061
0.88821752	0.945205479	0.6875	0.58540925	0.57106599
0.90123457	0.881818182	0.7421875	0.61191336	0.58163265
0.60950413	1.189189189	0.61896552	0.64772727	0.3755102
0.60245902	1.23603352	0.66901408	0.62750716	0.42244898
0.62809917	1.256944444	0.65770609	0.61449275	0.37755102

### RESUMEN

GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA
100% HR	6	4.49881532	0.74980255	0.02251514
97% HR	6	6.32654241	1.05442374	0.0380166
84% HR	6	4.03174385	0.67195731	0.00168734
74% HR	6	3.68091262	0.61348544	0.00050918
32% HR	6	2.94652946	0.49108824	0.01234863

### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.07224449	4	0.26806112	17.852440 7	4.82866E-07	2.75871059
Dentro de los grupos	0.37538442	25	0.01501538			
Total	1.44762891	29				

Ho: Todas las medias son iguales

Ha: Al menos una media difiere de las restantes

Conclusión: Rechazo Ho, al menos una media difiere de las restantes.

B) Prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales para probar que la media muestral de la hidrofobicidad de biopelícula sobre polipropileno difiere de la hidrofobicidad de biopelícula sobre acero inoxidable y que ambas difieren de aquélla medida en biomasa suspendida de recirculación.

#### DATOS

PROLIPROPILENO	ACERO INOX	BIOMASA RECIRC
0.615254	0.693333	0.980263
0.574733	0.754325	0.983553

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	PROLIPROPILENO	ACERO INOX
Media	0.594993667	0.723829296
Varianza	0.000820981	0.001860008
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0.001340494	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-3.518871993	
P(T<=t) una cola	0.036065271	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998731	
P(T<=t) dos colas	<b>0.072130542</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	4.302655725	

Ho:  $m_1 = m_2$

Ha :  $m_2$  difiere de  $m_1$

Conclusión: No hay evidencia suficiente para rechazar Ho

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales.

	ACERO INOX	BIOMASA RECIRC
Media	0.723829296	0.981907895
Varianza	0.001860008	5.41032E-06
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0.000932709	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	-8.45043227	
P(T<=t) una cola	0.006858113	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998731	
P(T<=t) dos colas	<b>0.013716226</b>	
Valor crítico de t (dos colas)	4.302655725	

Ho:  $m_1 = m_2$

Ha:  $m_1$  difiere de  $m_2$

Conclusión: Rechazo Ho

C) Prueba t de Student para dos muestras suponiendo varianzas iguales para probar que la media muestral de la hidrofobicidad de células creciendo en glucosa difiere de la hidrofobicidad de células creciendo en tolueno.

DATOS

GLUCOSA	TOLUENO
0.863333	0.806667
0.886667	0.766667
0.9	0.843333

### Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	GLUCOSA	TOLUENO
Media	0.883333	0.805556
Varianza	0.000344	0.00147
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.000907	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	3.162278	
P(T<=t) una cola	0.017055	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846	
P(T<=t) dos colas	0.034109	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776451	

Ho:  $m_1 = m_2$

Ha:  $m_1$  difiere de  $m_2$

Conclusión: Rechazo Ho

### 8.8 Cinéticas de consumo de sustratos

Consumo de tolueno y respirometría en biopelícula formada sobre placas de acero inoxidable

Inóculo 20% cultivo mixto formado por 5 bacterias y dos levaduras

Sustrato, medio mineral adicionado con 1.37 g/L/d de Glucosa, pH mantenido con 7 con

NaOH 1N

Cultivo aireado, mantenido a 26°C en cuarto de temperatura controlada.

Crecimiento de biopelícula 12 días del Do 20/02/00 al Vi 03/03/00

